



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Charakterisierung der Wirkung ausgewählter
GABA_A-Liganden *in vitro* und *in vivo*

verfasst von

Erwin Kirnbauer

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. GABA	1
1.2. Der GABA _A -Rezeptor	3
1.2.1 Struktur	3
1.2.2 Verteilung, Funktionen und Kombinationsmöglichkeiten der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten	5
1.2.3. Struktur der GABA-Bindungsstelle	9
1.2.4. Gating	10
1.2.5. Phasische und tonische Inhibition	11
1.2.6. Modulatoren	12
1.2.6.1. Benzodiazepine	13
1.2.6.2. Barbiturate	17
1.2.6.3. Neurosteroid	19
1.2.6.4. Anästhetika	21
1.2.6.5. Loreclezol und andere Antikonvulsiva	24
1.2.6.6. Ethanol	28
1.3. Erkrankungen assoziiert mit Fehlfunktionen des GABAergen Systems	30
1.3.1. Angststörungen und Depressionen	30
1.3.2. Schlafstörungen	31
1.3.3. Epilepsie	33
1.3.4. Schizophrenie	36
1.4. Der GABA _B -Rezeptor	38
2. Problemstellung und Zielsetzung	40
3. Methoden	41
3.1. <i>In vitro</i> Untersuchungen	41
3.1.1. Verwendete Lösungen	41
3.1.2. Oozytenpräparation	42
3.1.3. Vorbereitung der cRNA	43
3.1.4. Injektion der cRNA	43
3.2.5. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp)	44
3.2. <i>In vivo</i> Untersuchungen	46
3.2.1. Versuchstiere	46
3.2.2. Injektionslösungen	46
3.2.3. Verhaltenspharmakologische Tests	47
3.2.3.1. Open-Field-Test (OF)	47
3.2.3.2. Light/Dark-Choice-Test (LDT)	48

3.2.3.3. Statistische Analyse der Daten.....	48
4. Ergebnisse.....	49
4.1. Modulation von $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ Rezeptoren durch ausgewählte Derivate von EK-0.....	49
4.1.1. Auswertung.....	49
4.1.2. GABA-Konzentrations-Wirkungskurve	50
4.1.3. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptor durch EK-1	51
4.1.4. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptor durch EK-2	52
4.1.5. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptor durch EK-3	53
4.1.6. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptor durch EK-4	54
4.1.7. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse anhand ausgewählter Parameter.....	55
4.2. Untersuchung der Effekte ausgewählter Derivate von EK-0 auf das explorative Verhalten im Open-Field-Test (OF)	56
4.2.1. Dosisabhängige Effekte von EK-1 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF	56
4.2.2. Dosisabhängige Effekte von EK-3 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF	58
4.2.3. Dosisabhängige Effekte von EK-5 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF	60
4.2.4. Dosisabhängige Effekte von EK-6 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF	62
4.3. Untersuchung der Effekte ausgewählter Derivate von EK-0 auf das angstbezogene Verhalten im Light/Dark-Choice-Test (LDT)	64
4.3.1. Dosisabhängige Effekte von EK-1 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT	64
4.3.2. Dosisabhängige Effekte von EK-3 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT	66
4.3.3. Dosisabhängige Effekte von EK-5 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT	68
4.3.4. Dosisabhängige Effekte von EK-6 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT	70
5. Diskussion	72
6. Zusammenfassung.....	75
7. Abstract.....	76
8. Literaturverzeichnis	77
9. Danksagung.....	86
10. Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1. GABA

Wirkung

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren. Insgesamt sind 20-30% der Neuronen GABAerg (Olsen and Sieghart, 2009; Rudolph and Knoflach, 2011). Erstmals wurde über das Vorhandensein von GABA im Säugetier-Gehirn 1950 berichtet (Awapara et al., 1950; Roberts and Frankel, 1950).

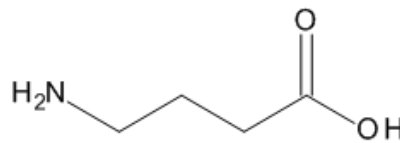


Abbildung 1: Strukturformel der γ -Aminobuttersäure

Ausschlaggebend für die Wirkung von GABA ist der Chloridionengradient über der Zellmembran. Bei Erwachsenen wird Chlorid durch den K^+ - Cl^- -Cotransporter 2 (KCC2) aus der Zelle gepumpt. Dadurch wird eine niedrige intrazelluläre Chloridionenkonzentration aufrechterhalten. Die Öffnung des Ionenkanals nach Bindung von GABA an den $GABA_A$ -Rezeptor führt deshalb zu Chlorideinstrom, Hyperpolarisation und damit Hemmung von Neuronen. In der Embryonalentwicklung wird aber zunächst nur der Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC1) exprimiert, der eine intrazelluläre Chloridkumulation bewirkt. Dies führt zur Depolarisation von Neuronen, weshalb GABA bei Neugeborenen exzitatorisch wirkt, was mit einer erhöhten Krampfneigung einhergeht (Ben-Ari, 2014; Hamidi and Avoli, 2015; Owens and Kriegstein, 2002; Wang and Kriegstein, 2010).

Der inhibitorische Effekt von GABA wird nicht nur durch $GABA_A$ -Rezeptoren vermittelt, welche ionotrope GABA-gesteuerte Chloridkanäle sind, sondern auch durch metabotrope $GABA_B$ -Rezeptoren (siehe Kapitel 1.4.) (Michels and Moss, 2007).

Biosynthese und Metabolismus

GABA wird durch die Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) aus Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter, synthetisiert. Von GAD existieren im Säugetierhirn 2 Isoformen, GAD65 und GAD67. GABA wird durch den vesikulären GABA Aminosäure-transporter (VGAT) in Vesikel verpackt und per Exozytose in den synaptischen Spalt transportiert, wo sie mit den GABA-Rezeptoren interagieren kann. Anschließend wird GABA

durch GABA-Transporter (GAT) zurück an die präsynaptische Membran (Recycling) oder zum Abbau zu den Gliazellen transportiert. Am ersten Abbauschritt ist das Enzym GABA-Transaminase (GABA-T) beteiligt, welches α -Ketoglutarat aus dem Citratzyklus (Krebszyklus) bereitstellt, um aus jedem abgebauten Molekül GABA ein Molekül Glutamat zu generieren. Hierdurch werden die Neurotransmitter-Pools von GABA und Glutamat kontinuierlich aufgefüllt und reguliert. Das Produkt der GABA-T-Reaktion ist Succinat-Semialdehyd (SSA), welches normalerweise über das Enzym Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSADH) zu Succinat umgewandelt wird. Aus Succinat wird im Citratzyklus α -Ketoglutarat gebildet. Die ständige Umwandlung von Glutamat zu GABA und zurück zu Glutamat wird auch als GABA-shunt bezeichnet. Des Weiteren wird die Glutamatvorstufe Glutamin in Gliazellen synthetisiert und zu den Neuronen transportiert, wo Glutamat und daraufhin GABA gebildet werden. Die Wiederaufnahme von GABA in Gliazellen und die Umwandlung zu Glutamin wird auch GABA-shuttle genannt (D'Hulst and Kooy, 2007).

GAD benötigt als Cofaktor das von Vitamin B6 abgeleitete Pyridoxalphosphat. Deshalb kann ein Vitamin B6-Mangel aufgrund verminderter GABA-Synthese zu Krämpfen und geistiger Retardierung führen (D'Hulst et al., 2009).

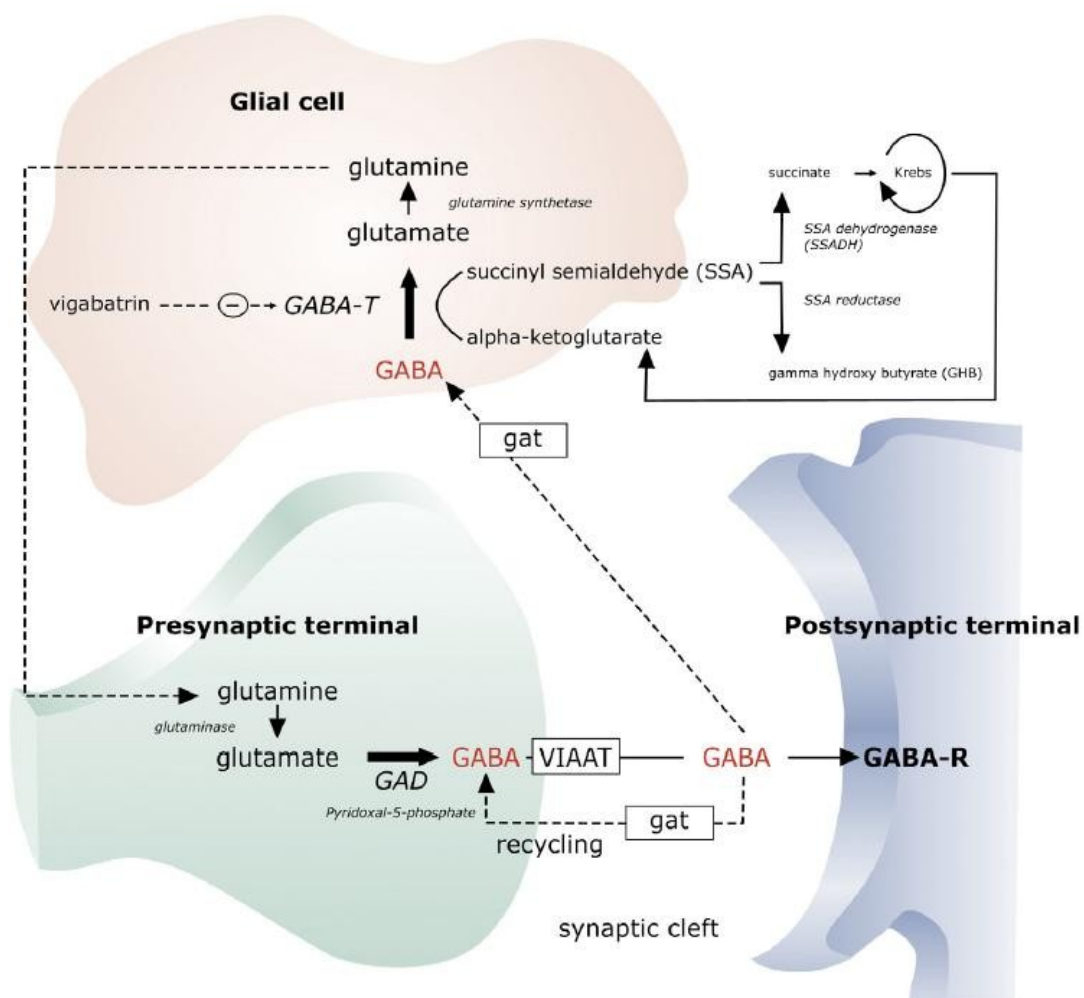


Abbildung 2: GABA-Metabolismus (D'Hulst and Kooy, 2007)

1.2. Der GABA_A-Rezeptor

GABA_A-Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren im Gehirn. Sie sind beteiligt an Angst, Wachheit, Bewusstsein, Ess- und Trinkverhalten, zirkadianem Rhythmus, Lernen und Merkfähigkeit. Sie zählen zu den ionotropen Rezeptoren (ligandengesteuerten Ionenkanälen), bei denen die Bindung des Agonisten zu einer Konformationsänderung führt, die eine Pore des Rezeptors für einen Ionentransfer durch die Zellmembran öffnet. Für gewöhnlich erzeugen sie schnelle, postsynaptische Reaktionen, die nur einige Millisekunden andauern. Dieser Rezeptortyp besteht aus zwei funktionellen Domänen: einer extrazellulären Domäne, an welche der Agonist/Neurotransmitter bindet und einer membranumspannenden Domäne, die den Ionenkanal bildet. Die Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle umfasst Cys-Loop-Rezeptoren wie GABA_A-, Glycin-, Serotonin-Typ-3(5-HT₃-)-Rezeptoren und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren, ionotrope Glutamat-Rezeptoren und ATP-gesteuerte Kanäle (D'Hulst et al., 2009; Miller and Aricescu, 2014). Diese Cys-Loop-Rezeptoren zeigen eine circa 30%ige Übereinstimmung in der Aminosäure-Sequenz, mit einer wahrscheinlich noch höheren Vergleichbarkeit in der Sekundär- und Tertiärstruktur (Olsen and Sieghart, 2009).

Die Bindung von GABA öffnet den intrinsischen Chloridionenkanal (D'Hulst et al., 2009; Miller and Aricescu, 2014). Durch den Einstrom negativ geladener Chloridionen wird die Membran postsynaptischer Neuronen hyperpolarisiert (D'Hulst et al., 2009).

1.2.1 Struktur

Der erste GABA_A-Rezeptor wurde 1987 isoliert und sequenziert (Michels and Moss, 2007). GABA_A-Rezeptoren sind heteromere Pentamere zusammengesetzt aus fünf Untereinheiten. Es wurden 19 unterschiedliche Untereinheiten identifiziert, die aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenzhomologie in 8 Untereinheitenklassen eingeteilt werden können, von denen einige mehrere Vertreter haben: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , ρ_{1-3} , and θ (D'Hulst et al., 2009; Michels and Moss, 2007; Miller and Aricescu, 2014). Während innerhalb einer Untereinheitenfamilie eine in etwa 70%ige Sequenzidentität besteht, ist die Sequenz bei Mitgliedern unterschiedlicher Familien nur zu 20 Prozent ident (Sigel and Steinmann, 2012). Die Gene für die GABA_A-Rezeptor Untereinheiten enthalten grundsätzlich 9 codierende Exons und 8 Introns. Von diesem Schema weichen nur die δ -Untereinheit mit 8 Exons und die γ_3 -Untereinheit mit 10 Exons ab (Sigel and Steinmann, 2012). Eine weitere strukturelle Komplexität existiert aufgrund von alternativem Spleißen der Untereinheiten, insbesondere der γ_2 Untereinheit, die als kurze (γ_{2S}) und lange Untereinheit (γ_{2L}) vorkommt, erkennbar an 8 zusätzlichen

Aminosäuren im Bereich des intrazellulären Loops der langen γ_2 -Form. Spleißvarianten sind auch bei der α_5 , α_6 , β_2 und β_3 Untereinheit entdeckt worden (D'Hulst et al., 2009; Michels and Moss, 2007; Sigel and Steinmann, 2012). Jede Untereinheit setzt sich aus einer 200-250 Aminosäuren großen extrazellulären Domäne (EZD), einem Bündel aus vier transmembranären α -Helices (TM1-TM4) und einem intrazellulären, 85-255 Aminosäuren langen Loop zwischen TM3 und TM4 zusammen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer N-terminalen α -Helix ($\alpha 1$), gefolgt von 10 β -strands, die zu einem β -Sandwich gefaltet sind. Unter der $\alpha 1$ -Helix ist zwischen β -strand 3 und 4 eine zweite α -Helix ($\alpha 2$) lokalisiert. An Asn8, Asn80 und Asn149 befinden sich drei N-Glykosylierungsstellen. Die Helices TM1 bis TM4 von jeder Untereinheit bilden zusammen die pentamere transmembranäre Domäne (TMD), wobei die TM2-Segmente die Ionenpore auskleiden, welche sich zur intrazellulären Seite der Membran hin verengt (siehe Abbildung 4) (Miller and Aricescu, 2014).

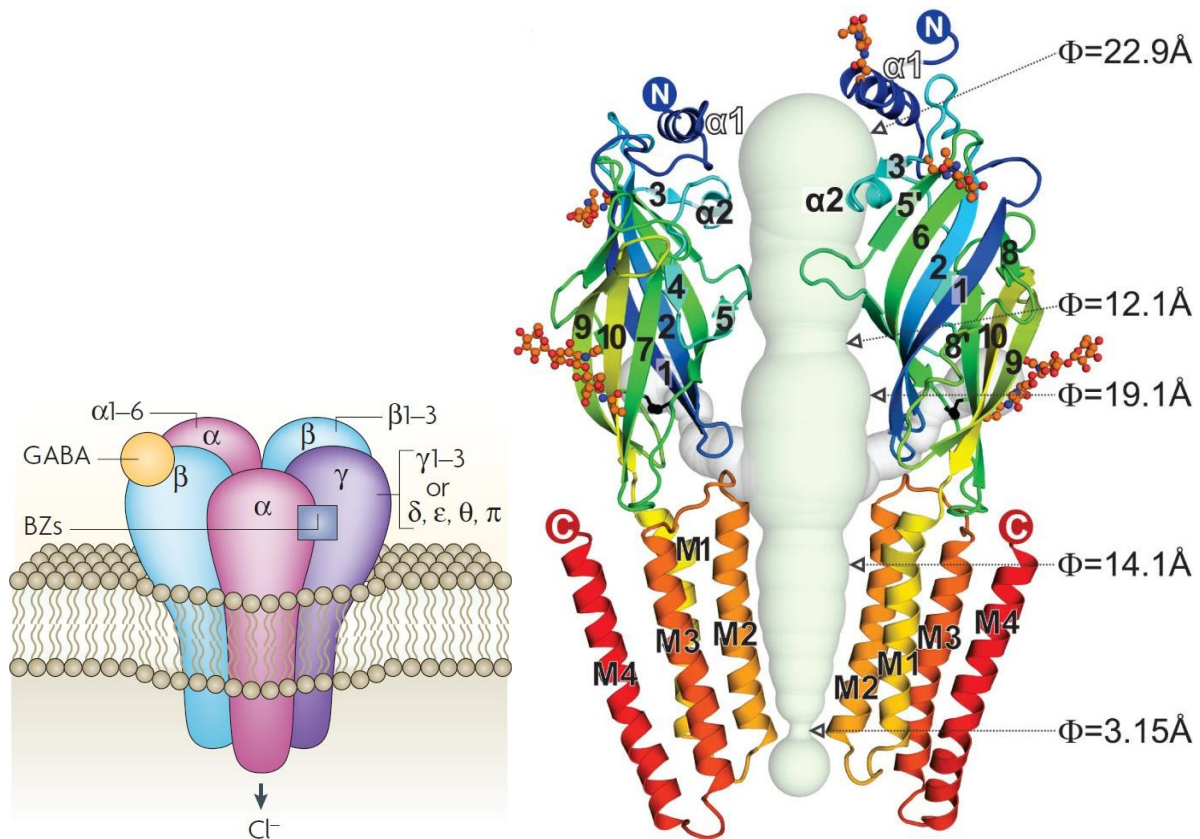


Abbildung 3 (links): Struktur des GABA_A-Rezeptors (Jacob et al., 2008)

Abbildung 4 (rechts) zeigt 2 β_3 Untereinheiten, regenbogenartig gefärbt vom blauen N-Terminus bis zum roten C-Terminus. Der Vorhof der EZD und die Pore der TMD sind hellgrün dargestellt. Sie werden seitlich von Tunnels (grau) der EZDs flankiert. N-Glykane sind orange im Kugel-Stab-Modell abgebildet (Miller and Aricescu, 2014)

1.2.2 Verteilung, Funktionen und Kombinationsmöglichkeiten der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

GABA_A-Rezeptoren kommen nicht nur im zentralen Nervensystem (ZNS) vor, sondern auch in der Leber, der glatten Muskulatur der Lunge und in einigen Arten von Immunzellen (Rudolph and Knoflach, 2011). Ihre beachtliche Heterogenität in Struktur und Pharmakologie ergibt sich aus der Kombination von 19 unterschiedlichen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten (siehe Abbildung 3). Es ist bei weitem noch nicht geklärt, wie viele Rezeptor Isoformen existieren (Sigel and Steinmann, 2012). Die Verteilung und Funktion der jeweiligen Rezeptor-Subtypen ist von Bedeutung für die Pharmakotherapie verschiedener neurologischer oder psychiatrischer Erkrankungen wie Schlaf-, Angst-, Gedächtnisstörungen und Schizophrenie (Möhler, 2006).

Vor der Kristallisation des β_3 -Homopentamers durch Miller und Aricescu (2014) lieferten Studien mit rekombinant exprimierten GABA_A-Rezeptoren wichtige Erkenntnisse über die Struktur des GABA_A-Rezeptors. Die Koexpression von α - und β -Untereinheiten in heterologen Zellen ist für die Assemblierung eines funktionsfähigen GABA_A-Rezeptors ausreichend, aber ein solcher Rezeptor hat eine geringe Einzelkanalleitfähigkeit und keine Benzodiazepinsensitivität. β_1 - und β_3 -Untereinheiten können auch spontan offene Chloridionenkanäle bilden, die nicht nur durch GABA, sondern auch durch Phenobarbital aktiviert und durch Picrotoxin gehemmt werden können. Die alleinige Expression der $\gamma_{2\delta}$ -Untereinheit resultiert dagegen nicht in der Bildung funktionsfähiger Kanäle. Einzeln exprimierte Untereinheiten (α , β oder γ) bilden keinen GABA-gesteuerten Chloridionenkanal aus, da sie im Endoplasmatischen Retikulum zurückbehalten und rasch abgebaut werden (Michels and Moss, 2007).

GABA_A-Rezeptoren können nicht nur postsynaptisch, sondern auch extra- und perisynaptisch lokalisiert sein (Sigel and Steinmann, 2012).

Der Großteil der GABA_A-Rezeptor Untereinheiten im Gehirn enthält unterschiedliche Varianten der α - und β -Untereinheiten in Kombination mit γ - oder δ -Untereinheiten. GABA_A-Rezeptoren, welche die α_4 -, α_5 -, α_6 - und δ -Untereinheiten enthalten, sind vorwiegend extrasynaptisch lokalisiert. Dagegen werden all die anderen GABA_A-Rezeptor Untereinheiten - vor allem die γ_2 -Untereinheit - vorzugsweise synaptisch exprimiert. Die Stöchiometrie der Untereinheiten nativer GABA_A-Rezeptoren ist nicht eindeutig definiert, aber der etablierte Konsensus, basierend auf rekombinanten Rezeptorstudien, favorisiert die Existenz von Pentameren zusammengesetzt aus 2 α , 2 β und 1 γ_2 Untereinheiten. Die häufigsten Rezeptorkombinationen wurden durch Immunolabelling und Autoradiographie nachgewiesen: $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (~ 60%), $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (~ 15%) und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ (~10%). Die Untereinheiten Kombinationen $\alpha_4\beta_2\gamma$

$\alpha_4\beta_n\delta$, $\alpha_5\beta_{1/3}\gamma_2$, $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_n\delta$ repräsentieren jeweils weniger als 5% aller GABA_A-Rezeptoren im Gehirn (Michels and Moss, 2007).

Wahrscheinlich können auch zwei unterschiedliche α - oder β -Untereinheiten gemeinsam in GABA_A-Rezeptoren vorkommen. Hingegen können vermutlich γ -Untereinheiten nicht mit weiteren γ -Untereinheiten, beziehungsweise δ -Untereinheiten nicht zusammen mit γ -Untereinheiten in einem Rezeptor exprimiert werden (Olsen and Sieghart, 2009).

Die weniger oft vorkommenden δ -, ϵ - und π -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors gelten als Austauschpartner für die γ_2 -Untereinheit, wohingegen die θ -Untereinheit dazu fähig sein könnte, die β -Untereinheit zu ersetzen (D'Hulst et al., 2009; Michels and Moss, 2007).

Jede Untereinheit hat eine bestimmte regionale und zelluläre Verteilung im Gehirn. Die meisten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sind konzentriert in dendritischen Regionen (zum Beispiel im Hippokampus, Cerebellum und Bulbus olfactorius), nur selten in axonalen Fasersträngen (D'Hulst et al., 2009).

Die **α_1 -Untereinheit** wird vor allem synaptisch (Möhler, 2006) in Kortex, Thalamus, Pallidum und Hippokampus exprimiert. Sie ist in 60% aller GABA_A-Rezeptoren in Kombination mit der β_2 - und γ_2 -Untereinheit enthalten und vermittelt Sedierung, Abhängigkeit, anterograde Amnesie und antikonvulsive Wirkung (Rudolph and Knoflach, 2011).

Meist synaptisch in Hippokampus, Kortex, Striatum und Nucleus accumbens ist die **α_2 -Untereinheit** lokalisiert (Möhler, 2006), welche zusammen mit der β_3 - und γ_2 -Untereinheit 15-20% der GABA_A-Rezeptoren bildet. Sie ist verantwortlich für Anxiolyse, Antihyperalgesie, Myorelaxation, antidepressive Wirkung und kognitive Beeinträchtigung bei Schizophrenie (Rudolph and Knoflach, 2011).

Die **α_3 -Untereinheit** ist größtenteils synaptisch (Möhler, 2006) in Kortex und Nucleus reticularis exprimiert und ermöglicht sensomotorisches Gating (Filterprozesse während der frühen Reizverarbeitung), Suppression thalamischer Oszillationen, Myorelaxation und Antihyperalgesie (Rudolph and Knoflach, 2011). Sie wird ebenso wie die α_2 -Untereinheit meist mit der β_3 - und γ_2 -Untereinheit coexprimiert und stellt in dieser Kombination, mit einem Anteil von 10%, den dritthäufigsten GABA_A-Rezeptor-Subtyp (Michels and Moss, 2007). Hauptverantwortlich für die Anxiolyse ist die α_2 -Untereinheit, aber bei hohen Benzodiazepin-Dosen und somit hoher Rezeptorbesetzung wird auch die α_3 -Untereinheit mit anxiolytischen Effekten in Verbindung gebracht (Rudolph and Möhler, 2006).

Im Gegensatz dazu ist die **α_4 -Untereinheit** extrasynaptisch im Gyrus dentatus und Thalamus lokalisiert (Möhler, 2006). Sie erkennt klassische Benzodiazepine wie Diazepam und Flunitrazepam nicht und wird deshalb als Diazepam-unsensitiv bezeichnet. Ihre Ethanol-Sensitivität ist hingegen erhöht (Michels and Moss, 2007).

Die **α_5 -Untereinheit** kommt ebenfalls hauptsächlich extrasynaptisch (Möhler, 2006) im Hippokampus und tiefen Schichten des Kortex vor und hat Einfluss auf sensorimotorisches Gating, Myorelaxation und kognitive Funktionen wie Lernen und Gedächtnis (Rudolph and Knoflach, 2011). α_5 -enthaltende GABA_A-Rezeptoren können Glutamat-vermittelte, NMDA-Rezeptor-abhängige, exzitatorische Transmission inhibieren. In Experimenten lieferten Mäuse mit einem Mangel an oder vollständigen Fehlen von α_5 -Untereinheiten im Hippokampus verbesserte Gedächtnis- und Lernleistungen. Dies lässt darauf schließen, dass die hippokampale tonische Hemmung über α_5 -umfassende GABA_A-Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der Modulation des assoziativen Gedächtnisses spielt. Ein α_5 -selektiver partieller inverser Agonist konnte ebenfalls die Gedächtnisfunktion steigern (Möhler et al., 2004; Rudolph and Möhler, 2006). Allerdings können α_5 -selektive inverse Agonisten auch anxiogen und antiaggressiv sein (Rudolph and Möhler, 2006).

Die **α_6 -Untereinheit** kann sowohl synaptisch als auch extrasynaptisch (Möhler, 2006) in Cerebellum und Nucleus cochlearis dorsalis exprimiert werden. Sie gehört genauso wie die α_4 -Untereinheit zu den Benzodiazepin-unsensitiven und verstärkt Ethanol-sensitiven Untereinheiten (Michels and Moss, 2007).

Die **β_1 -Untereinheit** ist meist im Hippokampus lokalisiert und kann durch 2-Hydroxybenzyliden selektiv inhibiert werden (Michels and Moss, 2007). Sie kommt im Vergleich zu den anderen beiden β -Untereinheiten weniger oft vor (Olsen and Sieghart, 2009).

Die unter anderem im Kortex, Pallidum, Hippokampus und Thalamus anzutreffende **β_2 -Untereinheit** ist die β -Untereinheit mit der höchsten Expressionsrate. Sie vermittelt vorwiegend die sedierend-hypnotischen Effekte von Etomidat (Michels and Moss, 2007; Möhler, 2006; Olsen and Sieghart, 2008)

Die **β_3 -Untereinheit** findet man im Striatum, Hippokampus und Cerebellum (Michels and Moss, 2007). Über diese Untereinheit werden die immobilisierenden Wirkungen von Etomidat und Propofol, zum Teil auch von Enfluran, Isofluran und Halothan vermittelt. Zusätzlich vermitteln β_3 -enthaltende GABA_A-Rezeptoren auch Teile der hypnotischen Effekte von Etomidat und Propofol. Weiters wird auch die atemdepressive Wirkung von Etomidat

und Propofol durch β_3 -umfassende Rezeptoren vermittelt, während die herzfrequenzsenkende und in weiten Teilen die hypothermische Wirkung von Etomidat und Propofol von anderen Targets vermittelt wird (Rudolph and Möhler, 2006).

Die **γ_2 -Untereinheit** hat eine große Bedeutung für die Benzodiazepin-Sensitivität, ist in circa 80% aller GABA_A-Rezeptoren enthalten und kann hiermit als die am häufigsten vorkommende Untereinheit bezeichnet werden. Die **γ_1 -** und **γ_3 -Untereinheiten** werden seltener exprimiert (Olsen and Sieghart, 2008) und ihre physiologischen Funktionen sind bis dato vorwiegend unbekannt (Möhler et al., 2002).

Die γ_1 -Untereinheit ist im Pallidum, den zentralen und medialen Nuclei der Amygdala und der Substantia nigra lokalisiert, die γ_2 - und γ_3 -Untereinheit findet man im gesamten Gehirn (Michels and Moss, 2007; Pirker et al., 2000).

Wie bereits erwähnt existieren von der γ_2 -Untereinheit die Spleißvarianten γ_{2s} und γ_{2l} . Bei Mäusen mit Knock-out der γ_{2l} -Untereinheit kommt es automatisch zur vermehrten Expression der anderen Spleißvariante, wodurch die physiologischen Funktionen erhalten bleiben. Mäuse mit Knock-out beider Spleißvarianten verlieren nicht nur vollständig die Benzodiazepin-Sensitivität, sondern sterben in der Regel perinatal, vermutlich weil die γ_2 -Untereinheit essentiell für das synaptische Clustering der GABA_A-Rezeptoren ist (Rudolph et al., 2001).

Die **δ -Untereinheit** wird im Cerebellum, Thalamus, Striatum und Gyrus dentatus exprimiert. Sie wird extrasynaptisch mit der α_4 - oder α_6 -Untereinheit kombiniert, wodurch die gebildeten GABA_A-Rezeptoren Benzodiazepin-unsensitiv, aber verstärkt Ethanol-sensitiv sind (Michels and Moss, 2007). Diese Rezeptoren weisen verlängerte Kanalöffnungszeiten auf und sind für die tonische Inhibition verantwortlich (Michels and Moss, 2007; Olsen and Sieghart, 2009). Im Vergleich zu γ_2 -umfassenden GABA_A-Rezeptoren zeigen sie eine erhöhte Affinität für GABA, Anästhetika, Neurosteroiden und GABA-Analoga wie Gabadoxol, Taurin und Ethanol (Olsen and Sieghart, 2009).

Die **$\rho_{1,3}$ -Untereinheiten**, welche hauptsächlich in Neuronen der Retina vorkommen und als Hetero- oder Homooligomere exprimiert werden, werden als eine eigenständige Art von GABA_A-Rezeptoren eingestuft und sind bekannt als GABA_{A0r}-Rezeptoren. GABA_A-Rezeptoren sind Bicucullin-sensitiv und GABA_B-Rezeptoren Baclofen-sensitiv. Im Gegensatz dazu sind GABA_{A0r}-Rezeptoren gegenüber beiden Substanzen unempfindlich (Michels and Moss, 2007). Darüber hinaus können sie weder durch Barbiturate, noch durch Benzodiazepine moduliert werden. Deshalb wurden diese Rezeptoren früher auch gelegentlich als GABA_C-Rezeptoren klassifiziert (Rudolph and Möhler, 2006). Das

Nomenklatur Komitee der IUPHAR stuft aber letztere als Subtypen von GABA_A-Rezeptoren ein, welche ρ_{1-3} -Untereinheiten enthalten, und lehnt die Verwendung des Begriffs GABA_C-Rezeptor ab (Olsen and Sieghart, 2009).

1.2.3. Struktur der GABA-Bindungsstelle

Die Bindung von Neurotransmittern an Rezeptoren der Cys-loop-Superfamilie findet an den extrazellulären N-terminalen Domänen zweier benachbarter Untereinheiten statt, und wird koordiniert von Aminosäureresten aus mindestens sechs nicht aneinander grenzenden Polypeptidregionen, bezeichnet als Loops A bis F, von denen sich in jeder Untereinheit drei befinden (Kloda and Czajkowski, 2007).

Die beiden GABA-Bindungsstellen befinden sich zwischen der β - und α -Untereinheit, zwischen α und γ binden Benzodiazepine. Die GABA-Tasche wird von den loops A, B und C der β^+ -Seite und von den loops D, E und F der α^- -Seite gebildet (Olsen and Sieghart, 2009).

Studien zeigten dass die GABA-Bindungsstasche aus aromatischen (α_1 Phe⁶⁴, β_2 Tyr⁹⁷, β_2 Tyr¹⁵⁷, β_2 Tyr²⁰⁵), hydroxylierten (β_2 Thr¹⁶⁰, β_2 Thr²⁰², β_2 Ser²⁰⁴, β_2 Ser²⁰⁹) und geladenen Aminosäuren (α_1 Arg⁶⁶, β_2 Arg²⁰⁷) aufgebaut ist (Newell and Czajkowski, 2003). Diese Aminosäuren müssen nicht unbedingt als Kontaktstellen für Agonisten/Antagonisten dienen, aber sie könnten die Struktur der GABA-Bindungsstasche stabilisieren oder lokale Konformationsänderungen mediiieren, die wichtig für die Aktivierung und/oder Desensibilisierung sind (Kloda and Czajkowski, 2007; Newell and Czajkowski, 2003).

Folgende Aminosäuren konnten als essentiell für die Bindung von GABA identifiziert werden:

In der β -Untereinheit:

- loop A: Leu⁹⁹ und Tyr⁹⁷
- loop B: Thr¹⁵⁷ und Thr¹⁶⁰ (Boileau et al., 2002)
- loop C: Ser²⁰⁴, Tyr²⁰⁵, Arg²⁰⁷ und Ser²⁰⁹

In der α -Untereinheit:

- loop D: Phe⁶⁴, Arg⁶⁶ und Ser⁶⁸ (Wagner and Czajkowski, 2001)
- loop E: Asn¹¹⁵, Leu¹¹⁷, Thr¹²⁹ und Arg¹³¹ (Kloda and Czajkowski, 2007)
- loop F: Val¹⁷⁸, Val¹⁸⁰ und Asp¹⁸³ (Newell and Czajkowski, 2003)

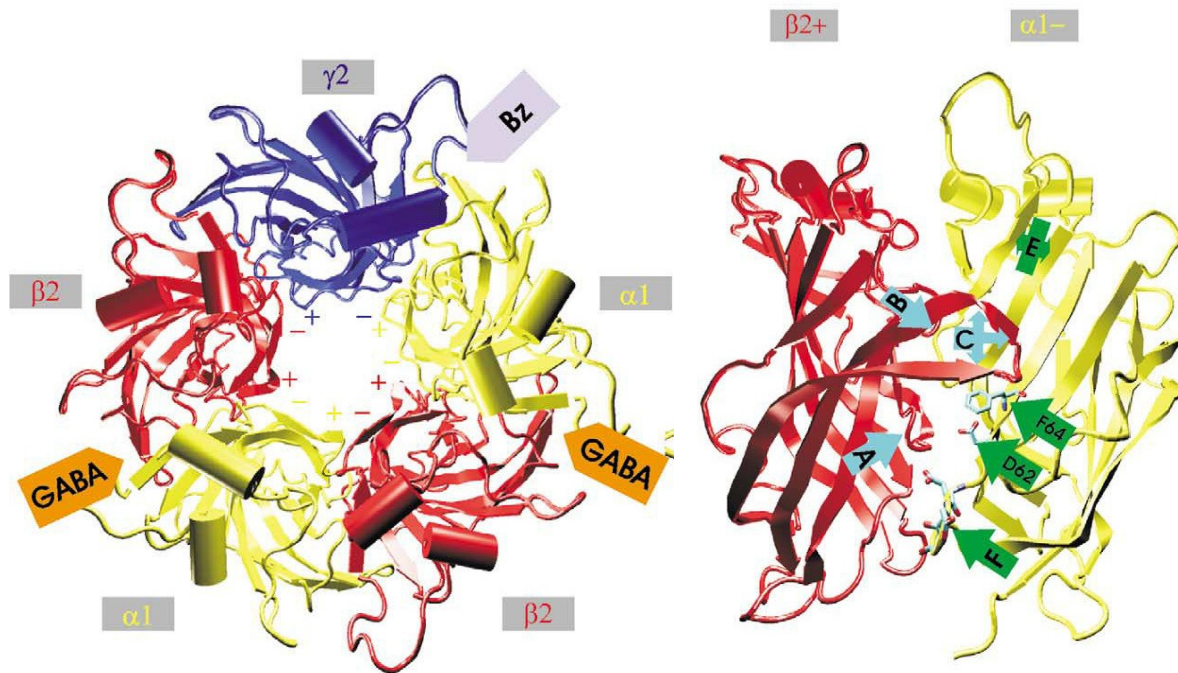


Abbildung 5: (Links) Darstellung eines GABA_A-Rezeptors mit der GABA- und Benzodiazepin-Bindungsstelle aus extrazellulärer Perspektive. **(Rechts)** An der GABA-Bindung beteiligte Loops und Aminosäuren an der Schnittstelle zwischen β^+ und α^- (Ernst et al., 2003).

1.2.4. Gating

Unter Gating versteht man die Öffnung eines Ionenkanals durch Konformationsänderungen der EZD und TMD, infolge der Bindung eines Neurotransmitters an die Ligandenbindungsstelle in der extrazellulären Domäne. Dieser schnelle und reversible Prozess ermöglicht Chloridionen beziehungsweise Bikarbonationen den Kanal zu passieren (Kash et al., 2004, 2003; Miller and Aricescu, 2014).

Damit die Bindung von Neurotransmittern zur Kanalöffnung führt, muss ein Signal von der EZD an die TMD übermittelt werden. Die inneren und äußeren β -Faltblätter jeder EZD sind über eine Ionenbindung zwischen Glu52 des β_1 - β_2 -Loops und Arg216 des β_{10} -strands verknüpft. Hierunter besteht die EZD-TMD-Schnittstelle aus 2 Gruppen von Interaktionen: polare Kontakte, die den äußeren Anteil des TM2-TM3-Loops mit dem β_6 - β_7 („Cys“)-Loop verbinden, und Van der Waals Kräfte zwischen Aminosäuren des inneren Anteils des TM2-TM3-Loops in der Nähe der Ionenpore, dem β_1 - β_2 -Loop und dem β_6 - β_7 -Loop. Wichtig für beide Gruppen ist das Pro144 des β_6 - β_7 -Loops, das eine cis-Konformation einnimmt, welche das benachbarte Carbonyl am Rückgrat des Tyr143 nach unten ausrichtet, wodurch es eine Wasserstoffbrücke mit den Aminogruppen des Rückgrats der TM3-Helix bildet. Diese Kontakte sorgen für die feste strukturelle Kopplung zwischen EZD und TMD. Die unter-

schiedlichen Zustände des GABA_A-Rezeptors (ruhend, aktiviert und desensibilisiert) sind vermutlich an Rotationen zwischen der EZD und TMD um etwa 20 Grad erkennbar (Miller and Aricescu, 2014).

Bei Agonisten-Bindung wird die Bindungsstelle durch eine Konformationsänderung des β 9- β 10-Loops (Loop C) verschlossen (Miller and Aricescu, 2014; Sigel and Steinmann, 2012). Die Schließung wird durch Ionenbindungen zwischen den Seitenketten von Arg207, Glu153 und Glu155 stabilisiert.

Pro Untereinheit kommen 3 N-Glykosylierungsstellen vor. Diese befinden sich am Asn8, am Asn 80 und am Asn149 des β 7-strands. Da sich das Glykan am Asn149 bis zu den strands β 9 und β 10 erstreckt, welche den Agonistenbindenden Loop C tragen, stellt es weitere Kontakte zwischen diesen und dem β 7-strand zur Verfügung, und könnte dadurch die Signaltransduktion zwischen EZD und TMD ermöglichen. Der Austausch von Asn149 in GABA_A-Rezeptoren, welche die β ₂-Untereinheit enthalten, reduziert die GABA-Sensitivität.

Der verengte intrazelluläre Anteil der Ionenpore wird durch Konformationsänderungen der Tyr299-Seitenketten geschlossen, indem sie die TM2-Helices an ihrer Rückseite nach unten drücken, und vermutlich durch Reduzierung dieser Kompression geöffnet (Miller and Aricescu, 2014).

1.2.5. Phasische und tonische Inhibition

Während die tonische Inhibition durch lang anhaltende Einwirkung niedriger GABA-Konzentrationen ausgelöst wird, wird die phasische Inhibition durch kurzfristige Freisetzung hoher GABA-Konzentrationen herbeigeführt. Die tonische Hemmung von Neuronen wird von den extrasynaptisch lokalisierten GABA_A-Rezeptoren vermittelt, welche wie schon im Kapitel 1.2.2. erwähnt, α ₄, α ₅, α ₆ und δ -Untereinheiten enthalten. Im Gegensatz dazu wird die phasische Inhibition bevorzugt von synaptisch vorkommenden GABA_A-Rezeptor Untereinheiten, insbesondere der γ ₂-Untereinheit, vermittelt (Michels and Moss, 2007).

Bei der phasischen Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren löst ein präsynaptischer Impuls rasch und präzise ein postsynaptisches Potential aus. Sobald also ein Aktionspotential die Präsynapse erreicht, triggert ein Einstrom von Calciumionen in das präsynaptisch lokalisierte Neuron die Verschmelzung synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran an der Freisetzungsstelle. Aus diesen Vesikeln werden dann hohe GABA-Mengen in den synaptischen Spalt freigesetzt, wodurch sich am Peak GABA-Konzentration im mM-Bereich bilden. Infolge dessen kommt es zur schnellen Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren an der gegenüberliegenden postsynaptischen Membran. Dies resultiert in einem hyperpolarisierenden inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP). Dass diese Form der Inhibition nur sehr kurz andauert, lässt sich mit der schnellen Wiederaufnahme von GABA

durch GAT aus dem synaptischen Spalt heraus erklären (Cellot and Cherubini, 2013; Farrant and Nusser, 2005). Die aus dem Spalt entfernte GABA kann auch Rezeptoren an präsynaptischen Endigungen oder an benachbarten Synapsen an den selben oder an angrenzenden Neuronen aktivieren. Durch dieses Phänomen, das auch als Spillover bezeichnet wird, oder durch nicht vesikuläre GABA-Freisetzung entstehen niedrige GABA-Konzentrationen, die im extrazellulären Raum extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren aktivieren und somit tonische Inhibition auslösen können (Farrant and Nusser, 2005; Möhler, 2006).

1.2.6. Modulatoren

GABA_A-Rezeptoren können sowohl von endogenen Neurosteroiden und Endocannabinoiden als auch von zahlreichen pharmakologisch wichtigen exogenen Substanzen moduliert werden; dazu gehören unter anderem Benzodiazepine, Barbiturate, Anästhetika und Ethanol (D'Hulst et al., 2009; Rudolph and Möhler, 2006; Sigel and Steinmann, 2012).

Die Interaktion dieser Stoffe mit allosterischen Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors beeinflusst die Bindeeigenschaften anderer Bindungsstellen dieses Rezeptors, wodurch der GABA-induzierte Chlorid-Ionen-Einstrom moduliert wird (D'Hulst et al., 2009).

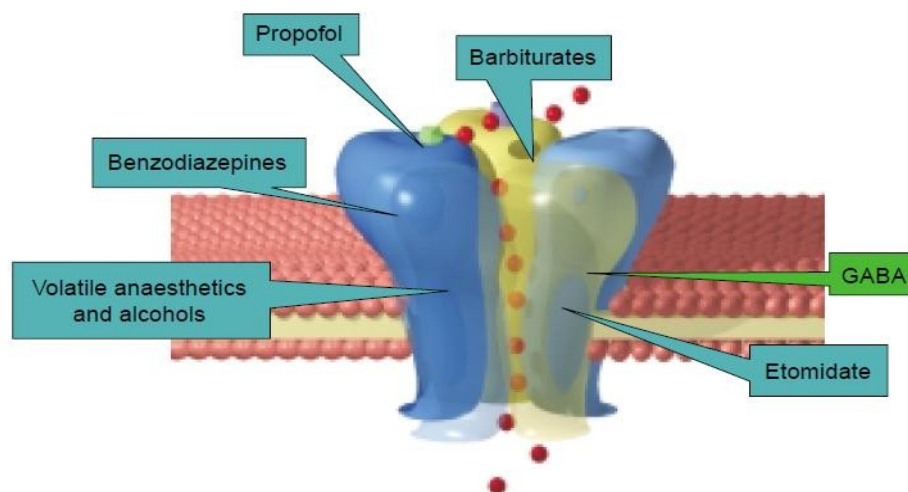


Abbildung 6: Darstellung der extrazellulären und transmembranären Bindungsstellen diverser Agonisten am GABA_A-Rezeptor (Whiting, 2003)

Weiters können GABA_A-Rezeptoren wie bei Proteinen üblich durch posttranslationale Modifikationen verändert werden. Zum Beispiel führt die Phosphorylierung mehrerer unterschiedlicher Aminosäurereste durch verschiedene Proteinkinasen zur Modulation der Kanalaktivität, Oberflächenstabilität und Rezeptorverankerung (Sigel and Steinmann, 2012).

1.2.6.1. Benzodiazepine

Das Grundgerüst der Benzodiazepine beruht auf der Fusion eines Benzenringes mit einem Diazepin, in welchem die zwei Stickstoffatome normalerweise in Position 1 und 4 lokalisiert sind.

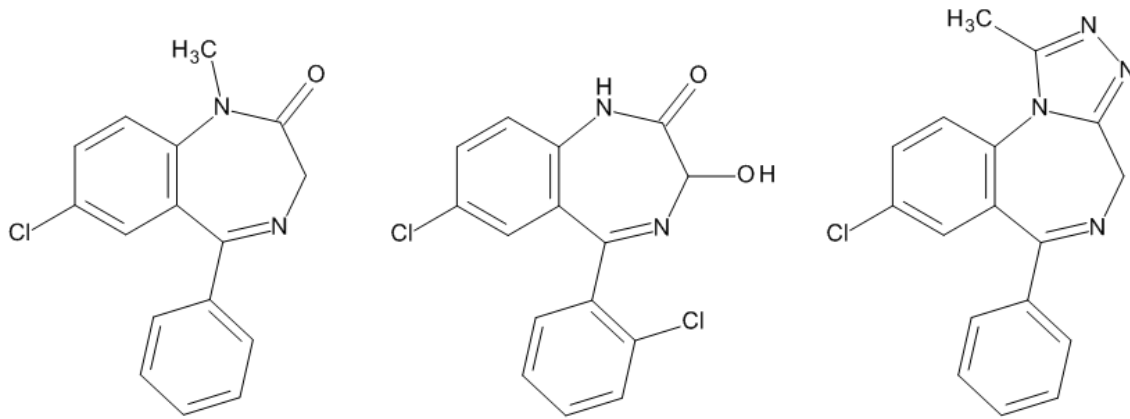


Abbildung 7: Strukturformeln von links nach rechts: Diazepam, Lorazepam, Alprazolam

In den 1950er Jahren wurde per Zufall herausgefunden, dass Benzodiazepine verschiedene therapeutisch relevante Effekte wie Anxiolyse, Sedierung, Muskelrelaxation und anti-krampfbildende Wirkung zeigen (Rudolph and Knoflach, 2011). Nach der Entdeckung des ersten Vertreters Chlordiazepoxid wurden 30 weitere Benzodiazepine wie Diazepam, Clonazepam, Lorazepam und Alprazolam auf den Markt gebracht. Sie werden üblicherweise aufgrund ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften in kurz-, mittel- und langwirksame Benzodiazepine eingeteilt (Tan et al., 2011). Als sedativ-hypnotische (schlaffördernde) Arzneimittel haben sie in erster Linie die Barbiturate auf Grund des wesentlich verbesserten therapeutischen Index ersetzt und gehören heute immer noch zu den am meisten verordneten Medikamenten.

Allerdings sind die zuvor genannten pharmakologischen Effekte aktuell verwendeter Benzodiazepine anhand der Dosierung nicht deutlich trennbar. Beispielsweise können sedierende Effekte auch dann auftreten, wenn Benzodiazepine als Tages-Anxiolytikum verabreicht werden, obwohl die anxiolytischen Wirkungen bei niedrigerer Dosierung wahrgenommen werden, als die sedativen Wirkungen. Desweiteren haben Benzodiazepine suchterzeugende Eigenschaften und eine Missbrauchsquote von schätzungsweise 0,1-0,2% der erwachsenen Bevölkerung. Zusätzlich können sich physische Abhängigkeit und Toleranz entwickeln, weshalb eine längerfristige Anwendung nicht empfehlenswert ist (Rudolph and Knoflach, 2011). Außerdem können Benzodiazepine anterograde Amnesie verursachen, welche normalerweise als unerwünschte Nebenwirkung charakterisiert wird, der Erinnerungsverlust kann sich aber auch als nützlicher Effekt beispielsweise bei invasiven medizinischen Eingriffen erweisen (Tan et al., 2011).

Seitdem die spezifischen Funktionen der jeweiligen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bekannt sind, wird an Untereinheiten-selektiven Wirkstoffen geforscht, um die unerwünschten Wirkungen klassischer Benzodiazepine zu beseitigen und somit zum Beispiel Anxiolyse ohne Sedierung ermöglichen zu können. Darüber hinaus könnten solche Wirkstoffe wertvoll für neue Indikationen wie chronische Schmerzen, Depression, Schizophrenie, Gedächtnissteigerung und Schlaganfall sein (Rudolph and Knoflach, 2011; Rudolph and Möhler, 2006). Benzodiazepine greifen relativ unselektiv an α_1 , α_2 , α_3 oder α_5 -Untereinheiten an und vermitteln ihre Wirkungen über eine allosterisch-modulatorische Bindungsstelle (Benzodiazepin-Bindungsstelle), die sich an fast allen GABA_A-Rezeptoren befindet. Hierbei modifizieren sie die Wirksamkeit und/oder Affinität von Agonisten (zum Beispiel GABA) durch eine Konformationsänderung des Rezeptors und regulieren somit deren Aktivität. Im Gegensatz zu den Barbituraten ist die GABA_A-Rezeptor-Modulation durch Agonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle selbstlimitierend. In Anwesenheit von GABA und Benzodiazepinen ist die Leitfähigkeit des Kanals nicht höher, als sie mit hohen GABA-Konzentrationen alleine erreicht werden kann. Weiters erhöhen Benzodiazepine die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chlorid-Ionen-Kanals und können diesen, im Gegensatz zu den Barbituraten, die die Öffnungsdauer erhöhen, nicht in Abwesenheit von GABA öffnen (Olsen and Sieghart, 2008; Rudolph and Knoflach, 2011).

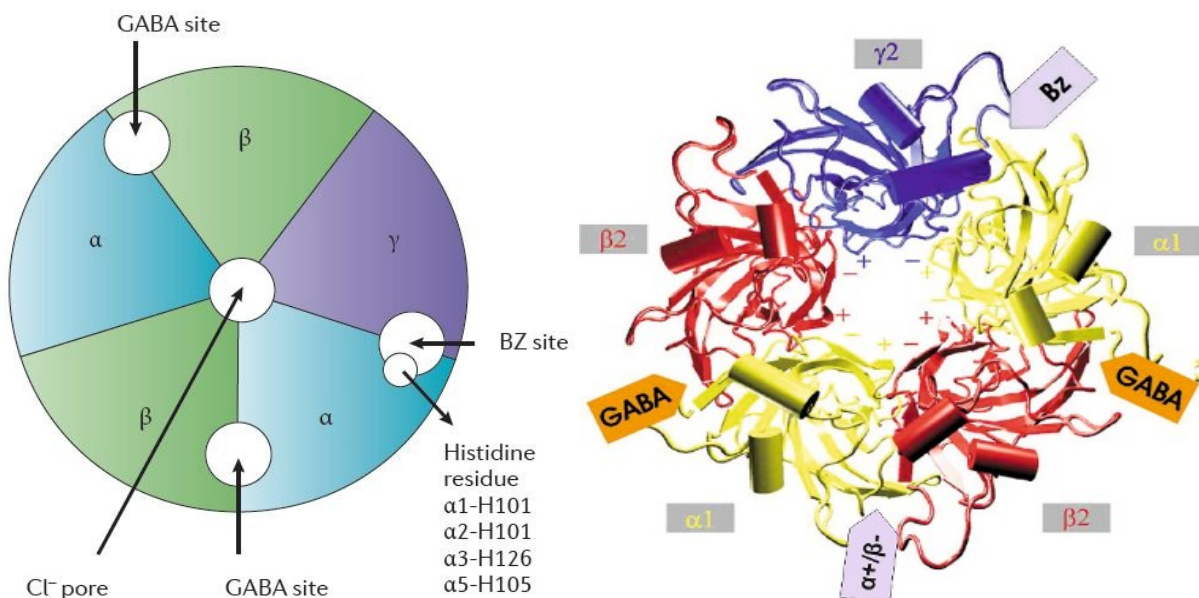


Abbildung 8 (links) zeigt die Benzodiazepinbindungsstelle zwischen der α - und γ -Untereinheit mit dem Histidin-Rest der jeweiligen α -Untereinheit (Rudolph and Knoflach, 2011).

Abbildung 9 (rechts): Extrazelluläre Domäne des GABA_A-Rezeptors mit den (+) und (-) Seiten jeder Untereinheit. Die Benzodiazepinbindungsstelle befindet sich an γ_2/α_1^+ , eine homologe Bindungsstelle wurde an α^+/β^- entdeckt (Ernst et al., 2003; Sieghart et al., 2012)

Wie in Abbildung 8 ersichtlich befindet sich die Benzodiazepin-Bindungsstelle zwischen einer α -Untereinheit (α_1 , α_2 , α_3 oder α_5) und einer γ -Untereinheit, typischerweise der γ_2 -Untereinheit, welche in ungefähr 80% aller GABA_A-Rezeptoren vorkommt (Olsen and Sieghart, 2008; Rudolph and Knoflach, 2011). An den seltener vorkommenden γ_1 - und γ_3 -umfassenden GABA_A-Rezeptoren ist die Aktivität der Benzodiazepine reduziert (Olsen and Sieghart, 2009).

Gebildet wird die Benzodiazepin-Bindungsstelle von den Aminosäuren der loops A-F (Hanson and Czajkowski, 2008). Einige Aminosäuren sind für die Benzodiazepinbindung essentiell. So muss in der α -Untereinheit im loop A Histidin 101 vorhanden sein, im loop B Glycin 157, Tyrosin 159 und Threonin 162. Im loop C werden folgende Aminosäuren benötigt: Glycin 200, Valin 202, Serin 204, Serin 205, Threonin 206, Tyrosin 209 und Valin 211. Bei der γ -Untereinheit sind im loop D Phenylalanin 77, Alanin 79, Threonin 81 und im loop E das Methionin 130 an der Ligandenbindung beteiligt (Hanson et al., 2008).

Vor kurzem wurde eine weitere Bindungsstelle an der $\alpha^+\beta^-$ Schnittstelle (siehe Abbildung 9) identifiziert, welche mit der zuvor beschriebenen Benzodiazepinbindungsstelle vergleichbar ist. Es wäre denkbar, dass Arzneistoffe, die mit dieser Bindungsstelle interagieren, in der Langzeittherapie der Epilepsie angewendet werden können (Sieghart et al., 2012).

Wie oben angeführt, muss die α -Untereinheit für die Benzodiazepinwirkung einen Histidin-Rest in Position 101 im Falle der α_1 Untereinheit, beziehungsweise in den korrespondierenden Positionen in den anderen Untereinheiten enthalten. An GABA_A-Rezeptoren, welche die α_4 - oder α_6 -Untereinheit enthalten, binden keine klinisch relevanten Benzodiazepine, da sich dort an Stelle des Histidins ein Arginin-Rest befindet (Tan et al., 2011). Deshalb wurden die Funktionen (siehe Abbildung 10) der einzelnen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten hauptsächlich mit genetisch modifizierten Mäusen erforscht, in welchen die jeweiligen GABA_A-Rezeptor- α -Untereinheiten durch Histidin-Arginin-Punktmutationen unempfindlich für Diazepam gemacht wurden. Diese Experimente zeigten, dass über die α_1 -Untereinheit die sedierende, anterograde amnestische und zum Teil die antikonvulsive Wirkung von Diazepam vermittelt wird. Für die anxiolytische Wirkung ist die α_2 -, und bei hoher Rezeptorbesetzung auch die α_3 -Untereinheit verantwortlich. Die muskelrelaxierende Wirkung wird in großem Ausmaß von α_2 - und teilweise von α_3 - und α_5 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren vermittelt (Olsen and Sieghart, 2008; Rudolph and Knoflach, 2011; Tan et al., 2011). Darüber hinaus wurden die Toleranzentwicklung gegenüber der sedierenden Wirkung der Benzodiazepine sowie zeitliche und räumliche Gedächtniseffekte, mit α_5 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren in Verbindung gebracht. Die Suchtentwicklung hat ihren Ursprung in der Area tegmentalis

ventralis, wo Benzodiazepine GABAerge Interneurone über deren α_1 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren hemmen und dadurch dopaminerge Neuronen enthemmen. In Folge dessen steigt der Dopaminspiegel im mesolimbischen System (Belohnungssystem). Daher könnten Untereinheiten-selektive Benzodiazepine, die die α_1 -Untereinheit nicht positiv modulieren, ein geringeres Suchtpotential aufweisen (Rudolph and Knoflach, 2011; Tan et al., 2011). Nennenswerte Vertreter hierfür wären Imidazo-Benzodiazepin-Carboxamid-Derivate um den Prototyp Imidazenil, die bei Affen und Nagetieren anxiolytische und antikonvulsive Wirkungen ohne Toleranz- und Abhängigkeitserscheinungen zeigten (Auta et al., 2010; Tan et al., 2011).

Neben den Benzodiazepinen wurden auch noch strukturell verschiedene Substanzen entwickelt, die ebenfalls an die Benzodiazepin-Bindungsstelle binden. Zolpidem, ein Imidazopyridin, hat eine hohe Affinität zu α_1 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren, eine 20-fach niedrigere Affinität zu α_2 - und α_3 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren und keine Affinität zu α_5 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren. Es wird somit oft als α_1 -selektiv bezeichnet und in der Behandlung der Schlaflosigkeit eingesetzt (Rudolph and Knoflach, 2011).

Neben den positiv allosterischen Modulatoren beziehungsweise Agonisten gibt es an der Benzodiazepin-Bindungsstelle auch die negativ allosterischen Modulatoren oder inversen Agonisten, die den GABA-induzierten Chloridioneneinstrom reduzieren. Verbindungen, die zwar mit der Benzodiazepinbindungsstelle interagieren, aber den GABA-induzierten Chloridionenstrom nicht beeinflussen, werden als neutrale Liganden oder Antagonisten bezeichnet und können die Wirkung von Agonisten oder inversen Agonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle blockieren. Darüberhinaus gibt es partielle Agonisten oder partielle inverse Agonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle, die die GABA-induzierten Chloridionenströme nur zum Teil allosterisch verstärken oder reduzieren (Olsen and Sieghart, 2008). Flumazenil, ein klassischer Antagonist, kann bei Benzodiazepinüberdosierung als Antidot verwendet werden (Möhler, 2011; Rudolph and Knoflach, 2011). β -CCM (Methyl-beta-carbolin-3-carboxylat) zählt zu den Vertretern der inversen Agonisten (Rudolph and Knoflach, 2011).

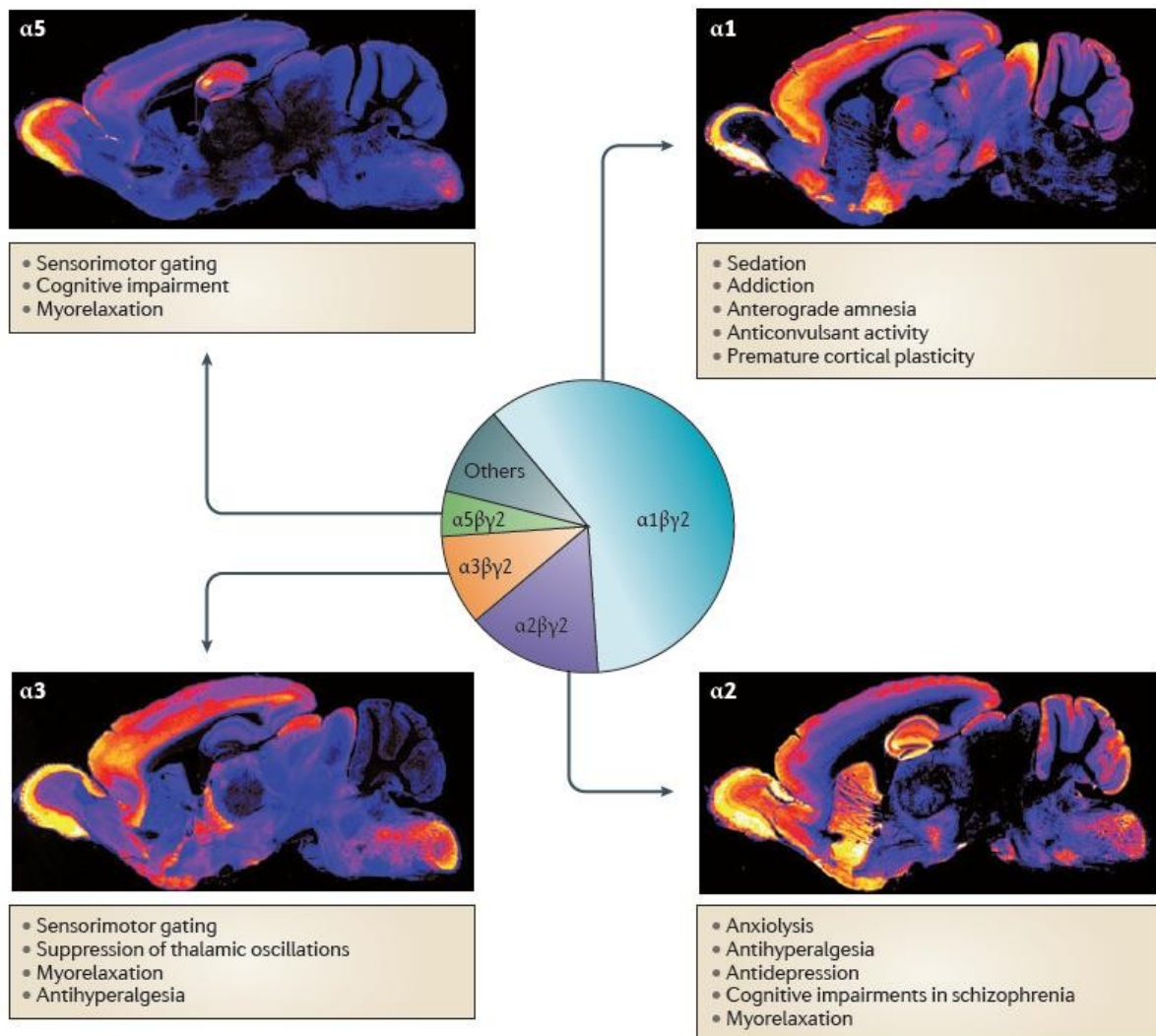


Abbildung 10: Verteilung und pharmakologische Effekte der α -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors im Mäusegehirn (Rudolph and Knoflach, 2011)

1.2.6.2. Barbiturate

Barbiturate verlängern die Kanalöffnungszeit und potenzieren die Wirkung von GABA an GABA_A-Rezeptoren und können diese bei höheren Konzentrationen auch direkt aktivieren. Kurz- und mittellangwirksame Barbiturate (Secobarbital, Amobarbital und Pentobarbital) wurden als Schlafmittel eingesetzt, langwirksame wie Phenobarbital als Anxiolytika und Antikonvulsiva (Löscher and Rogawski, 2012). Ultrakurzwirksame Verbindungen waren vor allem nützlich zur Narkoseeinleitung, wobei Thiopental hierfür heute immer noch eingesetzt wird (Löscher and Rogawski, 2012; Oakley et al., 2012).

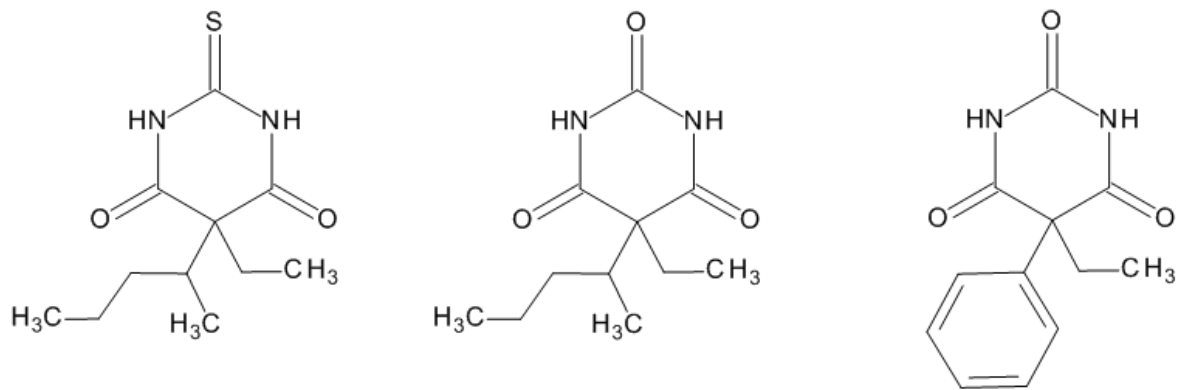


Abbildung 11: Strukturformeln von Thiopental, Pentobarbital und Phenobarbital

Barbiturate fanden während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts eine breite Anwendung. Es wurden zahlreiche Derivate entwickelt, aber kein einziges konnte die großen Nachteile dieser Substanzklasse eliminieren. Bei diesen handelt es sich um Nebenwirkungen wie Sedierung, physische Abhängigkeit bei verlängerter Anwendung, Exazerbation von Krämpfen nach dem Absetzen, und Tod durch Atemdepression infolge Überdosierungen. Dies führte nach der Entwicklung der weitaus sichereren Benzodiazepine zu einer deutlich verringerten therapeutischen Anwendung. Obwohl nur mehr wenige Barbiturate am Markt erhältlich sind, wird Phenobarbital immer noch häufig als antikonvulsives und sedierend/hypnotisches Mittel, speziell in den Entwicklungsländern, eingesetzt.

Studien zeigten, dass Barbiturate über eine allosterische Bindungsstelle die Öffnungszeit des durch GABA aktivierten GABA_A -Rezeptors erhöhen, ohne die Leitfähigkeit oder Öffnungsfrequenz des Kanals zu ändern. Bei hohen Dosierungen können Barbiturate den Chloridkanal allerdings direkt aktivieren und bei maximaler Dosis sogar blockieren. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu den Benzodiazepinen, welche an einer anderen Bindungsstelle des GABA_A -Rezeptors die Öffnungsfrequenz des Chloridkanals erhöhen, den Kanal aber nicht direkt, also bei Abwesenheit von GABA aktivieren können. Weiters kann der Chloridstrom durch Benzodiazepine nur beschränkt verstärkt werden, durch Barbiturate hingegen um ein Vielfaches. Außerdem agieren Benzodiazepine ausschließlich an GABA_A -Rezeptoren, wogegen Barbiturate an viele weitere Targets im Gehirn und der Peripherie binden, wo sie unter anderem AMPA/Kainat-Rezeptoren blockieren oder spannungsabhängige Natrium- und Calciumkanäle hemmen, und so beispielsweise auch zu kardialen Nebenwirkungen führen können. Diese Unterschiede erklären die deutlich höhere Sicherheit der Benzodiazepine gegenüber den Barbituraten (Löscher and Rogawski, 2012).

Die Barbituratbindungsstellen wurden an $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ GABA_A -Rezeptoren mit Hilfe eines photoreaktiven Barbiturats identifiziert. Sie befinden sich an den α^+/β^- und γ^+/β^- Schnittstellen in der TMD, 3 Helixwindungen unterhalb der EZD. An der (+)-Seite ist das Ala291 und Tyr297 der α_1 -Untereinheit und das Ser301 der γ_2 -Untereinheit an den Bindungsstellen

beteiligt, und an der (-)-Seite das Met227 der β_3 -Untereinheit. Diese Bindungsstellen sind unterschiedlich, aber homolog zu den Bindungsstellen von Etomidat an den beiden β^+/α^- Schnittstellen, und sind auf gleicher Höhe in der TMD lokalisiert. Die jeweiligen Barbiturate, Profol- und Etomidat-Analoga binden mit unterschiedlicher Selektivität an diese beiden Arten von Bindungsstellen. Vermutlich ist die Bindung an eine dieser Schnittstellen für die Auslösung anästhetischer Wirkungen ausreichend (Chiara et al., 2013).

Obwohl Phenobarbital nur ein etwas weniger potenter GABA_A-Rezeptor-Modulator als Pentobarbital ist, wirkt es kaum sedierend bei antikonvulsiver Dosierung. Dies könnte einerseits dadurch erklärt werden, dass Pentobarbital die GABA-Bindung sowohl im Neokortex als auch im Thalamus verstärkt, Phenobarbital aber nur selektiv im Neokortex, im Thalamus lediglich bei potentiell toxischer Dosierung. Andererseits kann Phenobarbital als partieller Agonist und Pentobarbital als voller Agonist bezeichnet werden, da bei Phenobarbital die maximale Verstärkung der Chloridströme am GABA_A-Rezeptor geringer ausfällt. Als weitere Gründe für die reduzierte sedierende Wirkung von Phenobarbital gelten eine geringere Neigung zu direkter GABA_A-Rezeptor Aktivierung und die verringerte Aktivität an anderen Ionenkanälen wie spannungsabhängigen Calciumkanälen.

Die zentral stimulierenden GABA-Antagonisten Picrotoxin und Pentylenetetrazol können die inhibitorischen Effekte der Barbiturate im ZNS aufheben. Deshalb werden sie bei Barbiturat-Vergiftungen und zur Beendigung der Barbiturat-induzierten Anästhesie verwendet (Löscher and Rogawski, 2012).

1.2.6.3. Neurosteroide

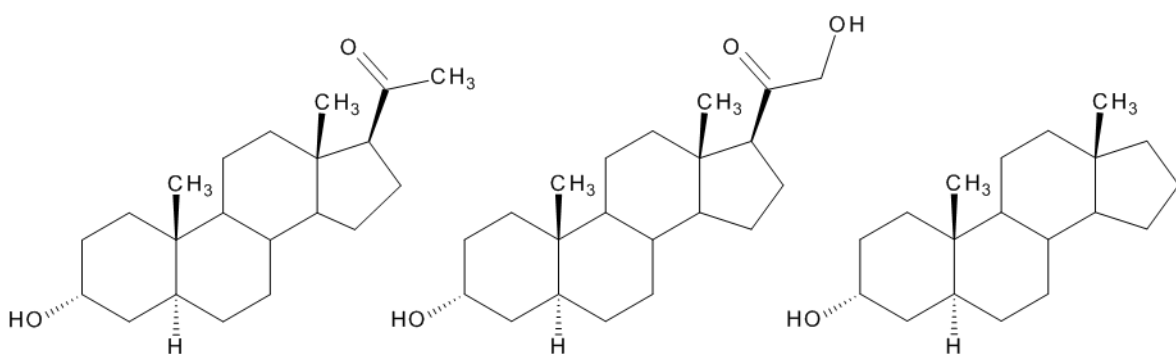


Abbildung 12: Strukturformeln von Allopregnanolon, Allotetrahyrodesoxycorticosteron und Androstanol (von links nach rechts)

Als Neurosteroide bezeichnet man Steroide, welche im ZNS, unabhängig von den peripheren endokrinen Drüsen, synthetisiert werden. Als Ausgangsverbindungen dienen neben Cholesterol auch peripher gebildete Steroidvorstufen, die aufgrund ihrer hohen

Lipophilie leicht ins Gehirn einwandern können. Die Pregnan-Steroide Allopregnanolon (3 α -Hydroxy-5 α -pregnan-20-on) und Allotetrahyrodesoxycorticosteron (3 α ,21-Dihydroxy-5 α -pregnan-20-on, THDOC) werden aus den Vorstufen Progesteron und Desoxycorticosteron synthetisiert. Die Androstan-Gruppe der Neurosteroiden einschließlich Androstanol (5 α -Androstan-3 α ,17 β -ol) und Androstandiol (5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol) wird von Testosteron abgeleitet. Die Reduktionsreaktionen werden durch die 5 α -Reduktase und anschließend durch die 3 α -Hydroxysteroidoxido-reduktase katalysiert.

Schon bei physiologischen Konzentrationen sind Neurosteroiden potente allosterische Modulatoren des GABA_A-Rezeptors mit sedierender, anxiolytischer und antikonvulsiver Wirkung. Bei niedrigen Konzentrationen wirken sie als positive Modulatoren des GABA_A-Rezeptors. Bei höheren Konzentrationen aktivieren die Steroide den Rezeptor direkt in Abwesenheit von GABA. Dies könnte therapeutisch nützlich sein bei akuten Krämpfen, wie etwa bei Status epilepticus.

Im Gegensatz zu den Benzodiazepinen (welche die Kanalöffnungsfrequenz erhöhen), oder Barbituraten (welche die Kanalöffnungszeit verlängern), erhöhen Neurosteroiden sowohl die Frequenz als auch die Öffnungszeit des Chloridkanals des GABA_A-Rezeptors (Carver and Reddy, 2013).

Die Wirkungen der Neurosteroiden werden über 3 oder 4 unterschiedliche transmembranäre Bindungsstellen vermittelt.

Über die modulatorische Bindungsstelle, die zwischen der TM1- und TM4- Domäne der α -Untereinheit lokalisiert ist, und Gln241, Asn407 und Tyr410 als wesentliche Aminosäuren enthält, verstärken niedrige Neurosteroid-Konzentrationen (nM) die Wirkung von GABA.

Über jene Bindungsstelle, die sich an der α/β -Schnittstelle zwischen TM1 und TM3 befindet, und α Thr236 und β Tyr284 als essentielle Aminosäuren beinhaltet, werden GABA_A-Rezeptoren bei hohen Neurosteroid-Konzentrationen (μ M) direkt aktiviert.

Da die genannten Aminosäuren an allen α - und β -Untereinheiten vorkommen, binden Neurosteroiden an alle GABA_A-Rezeptor-Subtypen, wobei die Affinität für extrasynaptische $\alpha\beta\delta$ -Subtypen besonders hoch ist (Hosie et al., 2007, 2006).

Darüberhinaus gibt es noch 1 oder 2 Bindungsstellen für die negativ modulatorischen, sulfatierten Neurosteroiden, deren Aminosäuren noch nicht genau bekannt sind, aber vermutlich in der TM1- und/oder TM2-Domäne lokalisiert sind (Hosie et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Benzodiazepinen, welche nur an jenen GABA_A-Rezeptoren wirken, welche die γ_2 -Untereinheit enthalten und zusätzlich eine $\alpha_{1,2,3,5}$, nicht aber die α_4 - und α_6 -Untereinheit, wirken Neurosteroiden an fast allen Untereinheiten-Kombinationen, sowohl an synaptischen als auch an extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren und verstärken folglich nicht nur die phasische, sondern auch die tonische Inhibition.

Extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren, welche die δ -Untereinheit enthalten sind darüber hinaus besonders empfindlich für Neurosteroid.

Strukturelle Voraussetzungen für die positive modulatorische Aktivität der Neurosteroid sind: eine 3 α -Hydroxygruppe als H-Brücken-Donor am steroidal A-Ring und eine Ketongruppe als H-Brücken-Akzeptor am D-Ring, entweder am C20 der steroidal Pregnan-Seitenkette oder am C17 des Androstan-Ringsystems.

Die Konzentrationen der Neurosteroid variieren in Plasma und Gehirn und sind abhängig von endokrinen Schwankungen infolge physiologischer Veränderungen wie Wachstum, Menstruationszyklus oder Stress.

Endogene Neurosteroid haben oft eine geringe Halbwertszeit aufgrund rascher Inaktivierung oder Umwandlung in andere steroidale Produkte. Um diese Limitationen zu beseitigen, wurden synthetische Neurosteroid-Analoga für die therapeutische Anwendung entwickelt. Ganaxolon ist ein Analogon des Allopregnanolons, bei welchem in der C3-Position eine β -Methyl-Gruppe eingeführt wurde. Es ist bis dato das einzige Neurosteroid, das in klinischen Studien für die Behandlung der Epilepsie getestet wurde. Das synthetische Derivat Minaxolon zeigte, dass es wie Allopregnanolon die extrasynaptische, GABAerge Leitfähigkeit erhöhen kann.

Da es bei Neurosteroiden, anders als bei den Benzodiazepinen, nicht zur Toleranzentwicklung kommt, haben diese das Potential in der Langzeitbehandlung der Epilepsie eingesetzt zu werden (Carver and Reddy, 2013).

1.2.6.4. Anästhetika

Als Mitte des 19. Jahrhunderts die ersten chirurgischen Eingriffe unter Narkose durchgeführt wurden, kamen noch Inhalationsanästhetika wie Lachgas und Chloroform zum Einsatz. Heutzutage werden verschiedene anästhesierende, muskelrelaxierende, sedierende und analgesierende Substanzen miteinander kombiniert (Rudolph and Antkowiak, 2004).

Anästhetika führen durch Inhibition der neuronalen Transmission in Hippokampus, Kortex, Thalamus, Rückenmark und Amygdala zu Bewusstlosigkeit, Immobilität und Amnesie (Eckle et al., 2009). Lange war man der Meinung, dass diese Effekte auf Wechselwirkungen mit der Lipiddoppelmembran zurückzuführen sind (Olsen and Li, 2011). Heute weiß man, dass Anästhetika sowohl ligandengesteuerte als auch spannungsabhängige Ionenkanäle, in erster Linie GABA_A- und NMDA-Rezeptoren, beeinflussen (Eckle et al., 2009).

Bei niedrigen Konzentrationen potenzieren sie die GABA-induzierten Chloridionenströme, bei höherer Dosierung öffnen sie den Chloridkanal direkt, unabhängig von GABA. Bei sehr hohen Konzentrationen können diverse Anästhetika den Ionenkanal auch hemmen (Bali and Akabas, 2004).

Inhalationsanästhetika

Zu den Vertretern der Inhalationsanästhetika gehören Halothan, Enfluran, Isofluran und Sevofluran (Kotani and Akaike, 2013). Sie werden vorwiegend zur Aufrechterhaltung der Narkose eingesetzt (Whiting, 2003). Inhalationsnarkotika binden vermutlich an alle GABA_A-Rezeptoren (Olsen and Li, 2011). Zu den Aminosäuren der α_1 -Untereinheit, die in oder in der Nähe der vermuteten Bindungstasche lokalisiert sind, gehören Leucin 232 (TM1), Serin 270 (TM2), Alanin 291 (TM3), Tyrosin 411, Threonin 414 und Tyrosin 415 (TM4) (Campagna-Slater and Weaver, 2007). Ebenfalls wichtig für die Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch Inhalationsanästhetika sind die Aminosäuren TM2-15' und TM3-4' an α - und β -Untereinheiten (Olsen and Li, 2011). Eine hohe Affinität haben Inhalationsanästhetika zu α_4 - und α_5 -Untereinheiten an extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren, wodurch sie tonische Hemmung auslösen. Da sie zusätzlich die Wiederaufnahme von GABA inhibieren, steigt die extrazelluläre GABA-Konzentration und damit verbunden die Dauer der tonischen Hemmung. Obwohl ihre Effekte über mehrere Mechanismen im Gehirn vermittelt werden könnten, könnten extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren den Hauptwirkort der Inhalationsnarkotika darstellen. Dagegen spricht aber, dass durch Inhalationsanästhetika hervorgerufene Narkosen nicht durch GABA-Antagonisten aufgehoben werden können (Kotani and Akaike, 2013).

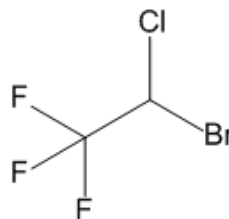


Abbildung 13: Strukturformel von Halothan

Injektionsanästhetika

Injektionsnarkotika wie Etomidat und Propofol werden vorwiegend zur Narkoseeinleitung angewendet (Whiting, 2003). Studien zeigten, dass Aminosäuren in der α - und β -Untereinheit für ihre Wirkung essentiell sind (Chiara et al., 2013; Li et al., 2006).

Für Etomidat gibt es 2 idente Bindungsstellen an den beiden β^+/α^- Schnittstellen in der TMD, 3 Helixwindungen unterhalb der EZD. Beteiligte Aminosäuren sind α_1 Met236 und α_1 Ile239 in TM1-Domäne und β_3 Met286 in der TM3-Domäne (Chiara et al., 2013; Jayakar et al., 2014). Das $\beta_{2/3}$ Asn265 der TM2-Domäne ist vermutlich nicht direkt in der Bindungstasche lokalisiert, aber zumindest nah genug, um mit Etomidat interagieren zu können (Olsen and Li, 2011). Es ist für die β -Selektivität von Etomidat von Bedeutung, dementsprechend ist die β_1 -Untereinheit mit einem Serin an korrespondierender Stelle unempfindlich gegenüber Etomidat (Chiara et al., 2013; Olsen and Li, 2011).

Anhand von knock-in Mäusen mit Punktmutationen in Position 265 der TM2-Domäne konnte festgestellt werden, dass die β_3 -Untereinheit für die anästhetischen Effekte von Etomidat

verantwortlich ist und die β_2 -Untereinheit unter anderem an der sedierenden Wirkung beteiligt ist (Olsen and Li, 2011). Somit wäre denkbar, dass Anästhetika mit einer Selektivität gegenüber β_3 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren die Regenerationszeit verringern, und den Patienten möglicherweise das Hangover-Gefühl ersparen könnten (Whiting, 2003).

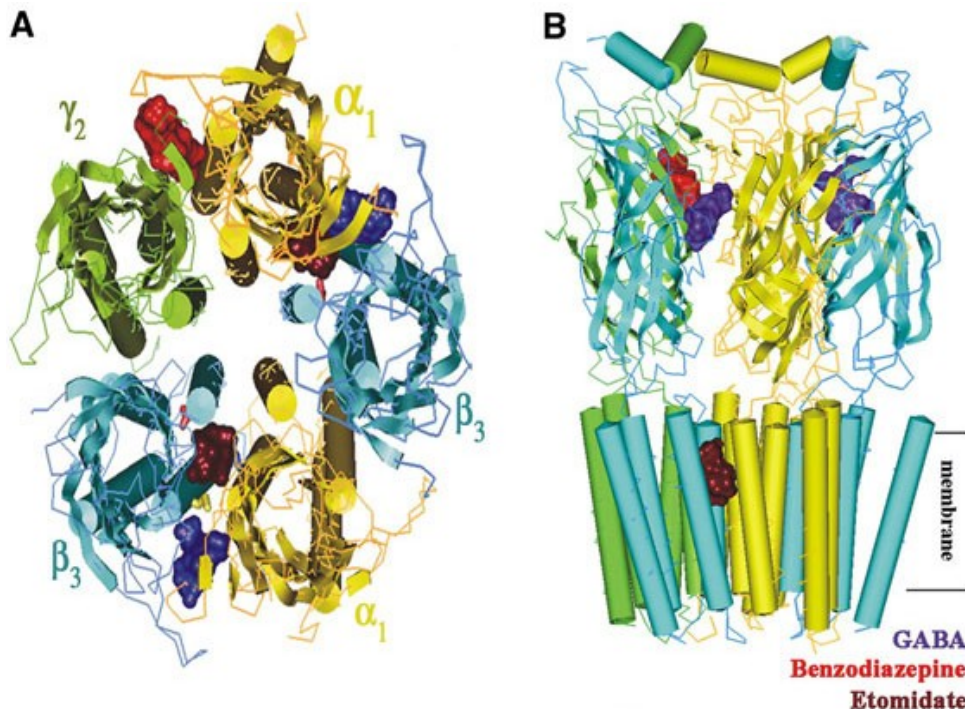


Abbildung 14: 3-Dimensionale Ansichten des GABA_A-Rezeptors aus unterschiedlichen Perspektiven mit den jeweiligen Bindungsstellen (Olsen and Li, 2011)

Propofol bindet an viele Untereinheiten-Schnittstellen in der TMD, unter anderem auch an die Etomidat- und Barbiturat-Bindungsstellen. Die Selektivität dieses einfach strukturierten Moleküls für die jeweiligen Bindungsstellen ist relativ gering. Wichtige Aminosäuren an den beiden β^+/α^- Schnittstellen sind α_1 Met236 und α_1 Ile239 in der TM1-Domäne, β_3 Asn265 in der TM2- und β_3 Met286 in TM3-Domäne. An der α^+/β^- Schnittstelle ist das β_3 Met227 der TM1-Domäne von Bedeutung. Ebenfalls an der Bindung beteiligt ist das β_3 Tyr422 der TM4-Domäne (Jayakar et al., 2014).

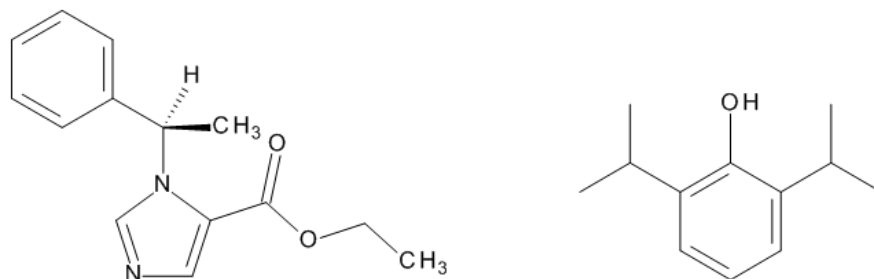


Abbildung 15: Strukturformeln von Etomidat (links) und Propofol (rechts)

1.2.6.5. Loreclezol und andere Antikonvulsiva

Ein wichtiges Target für Antikonvulsiva ist der GABA_A-Rezeptor. Sie interagieren mit unterschiedlichen Bindungsstellen dieses Rezeptors und werden zur Behandlung oder Prävention von Krämpfen eingesetzt. Während bei den Benzodiazepinen, Barbituraten und Loreclezol die Modulation des GABA_A-Rezeptors der primäre oder einzig bekannte Mechanismus der antikonvulsiven Wirkung ist, ist die Wirkung am GABA_A-Rezeptor für Topiramat, Felbamat, Retigabin, Losigamon und Stiripentol nur einer von mehreren möglichen Mechanismen.

Andere Substanzen verstärken die GABAerge Hemmung durch Erhöhung der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt und in perisynaptischen oder extrasynaptischen Bereichen. Die Steigerung der Synthese oder die Hemmung der Wiederaufnahme oder des Abbaus von GABA könnten das inhibitorische postsynaptische Potential verlängern und das perisynaptische Spillover erhöhen, wodurch die tonischen extrasynaptischen GABA-Ströme verstärkt werden, welche vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Prävention von Krämpfen spielen.

Loreclezol potenziert GABA_A-Rezeptoren, welche die β_2 - oder β_3 -Untereinheit enthalten und zeigt keine Wirkung an β_1 -Untereinheiten. Für die Modulation essentiell ist die Aminosäure Asparagin in Position 289 der β_2 -Untereinheit und Position 290 der β_3 -Untereinheit an der cytoplasmatischen Seite der TM2-Domäne. An entsprechender Stelle der β_1 -Untereinheit befindet sich ein Serin. Das Ausmaß der Potenzierung durch Loreclezol ist auch folgendermaßen abhängig von der α -Untereinheit: $\alpha_1=\alpha_2=\alpha_3>\alpha_5>\alpha_4$ (Greenfield, 2013).

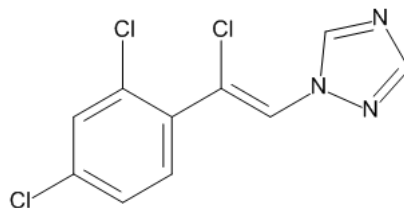


Abbildung 16: Strukturformel Loreclezol

Ganaxolon (3 α -OH-3 β -methyl-5 α -pregnan-20-on) ist ein synthetisches, 3 β -methyliertes Analogon des Neurosteroids und Progesteron-Metaboliten Allopregnanolon. Die 3 β -Methylgruppe verzögert den Abbau der 3 α -OH-Gruppe und verlängert damit die Wirkung. Ganaxolon verstärkt die Bindung von GABA und Benzodiazepinen durch positive allosterische Modulation des GABA_A-Rezeptors. Während es bei nanomolaren Konzentrationen die GABA-induzierten Ströme an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$, $\alpha_2\beta_1\gamma_{2L}$ oder $\alpha_3\beta_1\gamma_{2L}$ Subtypen

potenziert, kommt eine direkte Aktivierung des Chloridkanals in beschränktem Ausmaß nur bei mikromolaren Konzentrationen zustande. Ganaxolon könnte nützlich sein bei Frauen mit katamenialer Epilepsie, welche mit erhöhter Krampfanfälligkeit aufgrund niedriger Progesteronspiegel während des Menstruationszyklus einhergeht, und bei Kindern mit infantilen Spasmen.

Topiramat ist ein heterozyklisches Sulfamat mit mehreren Wirkmechanismen einschließlich der Hemmung von Natrium- und Kalzium-Kanälen, Hemmung der Carboanhydrase und Verstärkung von GABA-induzierten Ionenströmen. Die Effekte von Topiramat am GABA_A-Rezeptor könnten einerseits zu seiner antikonvulsiven Wirksamkeit, und andererseits zu dessen Nebenwirkungen, wie etwa Gedächtnisstörungen, beitragen. Es ist zugelassen für partielle und generalisierte Anfälle, das Lennox-Gastaut-Syndrom und Migräne.

Felbamat wurde 1993 als vielversprechendes Antikonvulsivum ohne aufgeklärten Wirkmechanismus zugelassen, aber nach frühen Berichten über aplastische Anämie und Leberversagen wurde die Anwendung eingeschränkt. Neben der Modulation von GABA_A-Rezeptoren, hemmt Felbamat auch noch die Ströme am N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor, einem anderen potentiell krampflösenden Mechanismus. Felbamat-Derivate wie Fluorofelbamat und Carisbamat könnten an Bedeutung gewinnen, da sie nicht mit hämatopoetischer oder hepatischer Toxizität in Verbindung gebracht werden (Greenfield, 2013).

Retigabin (Ezogabin) öffnet Kv7(KCNQ)-Kaliumkanäle bei Konzentrationen von 1-6 μM . Ab 10 μM ist Retigabin ein Untereinheiten-selektiver Modulator von GABA_A-Rezeptoren mit einer Präferenz für extrasynaptische δ -enthaltende Rezeptoren, welche tonische Inhibition vermitteln. Therapeutische Konzentrationen von Retigabin im Gehirn erreichen Werte um 10 μM und sind ausreichend, um neben Kv7-Kanälen auch δ -enthaltende GABA_A-Rezeptoren zu modulieren. Diese Eigenschaft könnte zu seiner breiten antiepileptischen Wirksamkeit beitragen und die fehlende Wirkung bei Absence-Anfällen erklären (Treven et al., 2015).

Losigamon ist ein neues antikonvulsives Arzneimittel, das an einer unbekannten Stelle des GABA_A-Rezeptors den Chlorideinstrom in spinalen Neuronen in Abwesenheit von GABA stimuliert und den durch submaximale GABA-Konzentrationen hervorgerufenen Chlorid-Einstrom potenziert. Weiters hemmt es Natriumströme in hippokampalen Neuronen.

Stiripentol ist ein adjuvantes Antikonvulsivum, dessen Wirkung bisher durch die Hemmung des Cytochroms P450 erklärt wurde, welches am Metabolismus konventioneller Antikonvulsiva beteiligt ist. Vor kurzem zeigte sich aber, dass Stiripentol die Ströme rekombinanter GABA_A-Rezeptoren verstärkt, mit einer größeren Potenzierung von Rezeptoren mit α_3 -Untereinheiten und einer verringerten Potenzierung von β_1 - oder ε -haltigen Kanälen. In Anwesenheit von Phenobarbital zeigt Stiripentol keinen Effekt. Zusätzlich erhöht es ebenso wie Barbiturate die Dauer, nicht aber die Frequenz der Kanalöffnung des GABA_A-Rezeptors. Daher schließt man auf Barbiturat-ähnliche Wirkmechanismen.

Dem GABA-Analogon **Gabapentin** wurde in einigen Studien die Modulation der für die Synthese von GABA und Glutamat verantwortlichen Enzyme zugeschrieben, die in einer erhöhten GABA-Synthese resultiert. Der andere, womöglich primäre Wirkmechanismus von Gabapentin ist die Bindung an die $\alpha_2\text{-}\delta$ -Bindungsstelle des präsynaptischen, spannungsabhängigen L- oder P/Q-Typ Kalziumkanals, wodurch vermutlich die exzessive Neurotransmitterfreisetzung inhibiert werden kann. **Pregabalin** bindet mit einer höheren Potenz an die $\alpha_2\text{-}\delta$ -Untereinheit und könnte einen ähnlichen Wirkmechanismus haben.

Valproinsäure steigert die Aktivität der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) und damit einhergehend die Synthese und Freisetzung von GABA in Gehirnregionen einschließlich der Substantia nigra, welche wahrscheinlich an der Entstehung und Ausbreitung von Krämpfen beteiligt ist. Sie reduziert außerdem die Freisetzung der γ -Hydroxybuttersäure und dämpft die durch NMDA-Typ Glutamat-Rezeptoren induzierte neuronale Exzitation. Weitere antikonvulsive Mechanismen sind die verstärkte Inaktivierung von Natriumkanälen und reduzierte T-Typ Kalziumkanal-Ströme, wodurch sich ihre Nützlichkeit bei sowohl fokal beginnenden Anfällen als auch Absence-Epilepsie erklären könnte.

Tiagabin ist ein Derivat der Piperin-3-carbonsäure, welches an den präsynaptischen GAT-1 GABA-Transporter bindet und die Wiederaufnahme von GABA hemmt. In Hippokampus-Schnitten induzierte Tiagabin alleine eine signifikante Chlorid-Leitfähigkeit, woraus man schließen kann, dass die GAT-1-Aktivität die basale extrazelluläre GABA-Konzentration reguliert. Weiters reduzierte Tiagabin epilepsieartige Entladungen in Hippokampus-Schnitten, welche niedrigen Magnesiumkonzentrationen oder 4-Aminopyridin ausgesetzt waren. Tiagabin war effektiv als adjuvantes Mittel gegen fokal beginnende Anfälle, jedoch haben die zeitaufwendige Dosistitration, die Notwendigkeit mehrfacher Einzeldosen pro Tag und die zentralen Nebenwirkungen zu einer verringerten Anwendung geführt.

Vigabatrin (γ -Vinyl-GABA) fungiert als „Selbstmord-Inhibitor“ der GABA-Transaminase, dem wichtigsten Enzym des GABA-Abbaus, wodurch sich im Umkehrschluss die GABA-Konzentration erhöht. Vigabatrin wirkt effektiv bei komplex partiellen Anfällen, Lennox-Gastaut-Syndrom und West-Syndrom, bei welchem es sich zu einer Alternative zu Corticotropin, besonders bei Kindern mit tuberöser Sklerose, entwickelt hat. Ein großer Nachteil von Vigabatrin ist die mit 10-40% der Patienten relativ hohe Inzidenz von Sehstörungen bei chronischer Anwendung (Greenfield, 2013).

Anti-konvulsivum	Untereinheiten-Spezifität	Bindungs-stelle	Wirkung am GABA _A -Rezeptor	Andere Mechanismen
Benzodiazepine	$\alpha_{1-3}, \alpha_5; \gamma$	α/γ -Schnittstelle, α_1 (H101)	Erhöhung der Öffnungsfrequenz	vermutlich $\uparrow$ Kanalleitfähigkeit des GABA _A -Rezeptors
Zolpidem	$\alpha_1 > \alpha_{2,3}; \gamma$	α/γ -Schnittstelle	Erhöhung der Öffnungsfrequenz	vermutlich $\uparrow$ Kanalleitfähigkeit des GABA _A -Rezeptors
Barbiturate	β -Untereinheiten?	Aminosäure der TM3?	$\uparrow$ Kanalöffnungszeit	„use-dependent“ Na ⁺ -Kanal-Block
Loreclezol	β_2, β_3	B2(N289)	Barbiturat-ähnlich?	hemmt GABA _A -Rez. bei $\uparrow$ Konzentration
Ganaxolon	$\alpha, \beta, \delta, \downarrow$ mit ϵ	α_1 (Q241)	Barbiturat-ähnlich und $\uparrow$ Öffnungsfrequenz	Block offener Kanäle bei $\uparrow$ Konzentration
Topiramat	$\alpha_6 > \alpha_4 > \alpha_1 - \alpha_2$?	unbekannt	verstärkte GABA Ströme	Na ⁺ /Ca ⁺ -Kanal-Block, AMPA/ kainat-Rezeptor-Block
Felbamat	unbekannt	unbekannt	Barbiturat-ähnlich	Blockiert NMDA-Rezeptor Ströme
Retigabin	unbekannt	unbekannt	$\uparrow$ inhibitorische postsynaptische GABA-Ströme	öffnet Kv7(KCNQ)-Kalium-Kanäle
Losigamon	unbekannt	unbekannt	verstärkte GABA Ströme	„use-dependent“ Na ⁺ -Kanal-Block
Stiripentol	$\alpha_3, \downarrow$ mit β_1, ϵ	unbekannt	Barbiturat-ähnlich	Hemmung von CYP450
Vigabatrin	GABA-Transaminase	-	erhöht [GABA]	-
Gabapentin, Pregabalin	Glutamatsäure-Decarboxylase	-	$\uparrow$ GABA-Synthese?	$\alpha_2 - \delta$ Untereinheit spannungsgesteuerter Ca ⁺ -Kanäle
Valproinsäure	Glutamatsäure-Decarboxylase	-	$\uparrow$ GABA-Synthese?	Block von Na ⁺ , T-Typ Ca ⁺ -Kanälen
Tiagabin	GAT1 (GABA-Transporter)	-	blockiert GABA-Wiederaufnahme	-

Tabelle 1: Antikonvulsiva und ihre Effekte am GABA_A-Rezeptor (Greenfield, 2013)

1.2.6.6. Ethanol

Neben Koffein und Nikotin ist Alkohol die mit Abstand am häufigsten konsumierte legale Droge (Davies, 2003; Olsen et al., 2007). Ethanol wirkt anxiolytisch, sedierend, hypnotisch, anästhetisch, antikonvulsiv, enthemmend, euphorisierend, aggressionsfördernd und beeinflusst die Sprache, Reaktionszeit, Koordinations- und Konzentrationsfähigkeit und das Urteilsvermögen (Davies, 2003; Kumar et al., 2009; Olsen et al., 2007). Diese Effekte zeigen sich erst ab einer Konzentration von 5-10 mmol/L im Blut (Davies, 2003). Konzentrationen im Bereich von 43-65 mmol/L führen zu Emesis und Bewusstseinsstörungen. Bei darüber liegenden Konzentrationen kommt es zum Koma und etwa 109 mmol/L können Tod durch Atemlähmung zur Folge haben (Davies, 2003).

Im Gegensatz zu vielen anderen Drogen kann Alkohol als kleines, amphiphiles Molekül die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren. Daher ist anzunehmen, dass die Alkohol-Konzentrationen an den Rezeptoren im Gehirn nicht stark von den Blutkonzentrationen abweichen. Abgebaut wird Ethanol durch das intrazelluläre Enzym Alkoholdehydrogenase.

Früher hat man angenommen, dass die Wirkungen des Alkohols auf die Erhöhung der Membranfluidität in Nervenzellen zurückzuführen sind. Heute weiß man, dass Ethanol ligandengesteuerte Ionenkanäle wie GABA_A-, NMDA-, Glycin- und 5-HT₃-Rezeptoren moduliert (Davies, 2003; Olsen et al., 2007). Die Ionenströme werden durch Ethanol einerseits an GABA_A- und Glycin-Rezeptoren verstärkt, und andererseits an NMDA-Rezeptoren gehemmt. Weiters werden spannungsgesteuerte Calciumkanäle inhibiert, welchen eine Schlüsselrolle bei der Neurotransmitterfreisetzung, Hormonsekretion, Genregulierung und Differenzierung zugeschrieben wird (Davies, 2003).

Bei jenen Rezeptoren, die empfindlich auf niedrige Alkoholkonzentrationen im Blut reagieren, wie etwa nach dem Konsum von einem Glas Wein, handelt es sich um extrasynaptische GABA_A-Rezeptoren, welche die δ -Untereinheit enthalten und tonische Inhibition vermitteln (Olsen and Li, 2011). Dementsprechend befinden sich die wichtigsten Bindungsstellen für Ethanol vermutlich an den Subtypen $\alpha_4\beta_3\delta$ oder $\alpha_6\beta_3\delta$ der extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren, da diese empfindlicher gegenüber niedrigen Ethanolkonzentrationen sind als Subtypen, welche die γ_2 -, β_1 - oder β_2 -Untereinheit enthalten (Olsen and Li, 2011; Wallner et al., 2003). Infolgedessen werden synaptische GABA_A-Rezeptoren wahrscheinlich erst bei einem höheren Blutalkoholgehalt aktiviert (Olsen et al., 2007).

Eine längerfristige Alkohol-Einnahme kann zu Toleranzentwicklung, Abhängigkeit und Entzugerscheinungen führen (Kumar et al., 2009; Uusi-Oukari and Korpi, 2010). Mitverantwortlich dafür sind möglicherweise Ethanol-induzierte Veränderungen bei der Expression und Internalisierung von Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors und die verringerte GABAerge Inhibition (Kumar et al., 2009). So wird zum Beispiel die Expression

der α_1 -Untereinheit verringert und die Bildung der α_4 -Untereinheit erhöht (Davies, 2003). Da die α_1 -Untereinheit zu den Benzodiazepin-sensitiven, und die α_4 -Untereinheit zu den Benzodiazepin-unsensitiven Untereinheiten gehört (Michels and Moss, 2007), wird dadurch die Wirkung von Benzodiazepinen oder anderen Liganden an der Benzodiazepin-Bindungsstelle reduziert (Davies, 2003).

1.3. Erkrankungen assoziiert mit Fehlfunktionen des GABAergen Systems

Defizite in der Expression oder Mutationen von GABA_A-Rezeptoren können zu verschiedensten neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen führen. Dazu gehören unter anderem Angststörungen, Depressionen, Epilepsie, Schizophrenie, Schlaganfall, Autismus, Chorea Huntington, Fragiles-X-Syndrom und das Prader-Willi-Syndrom (D'Hulst et al., 2009; Hines et al., 2012).

1.3.1. Angststörungen und Depressionen

Angst und Depression sind die häufigsten Folgen von chronischem Stress bei Menschen und Tieren. Die Mechanismen der Furcht haben sich vermutlich entwickelt, um bei der ersten Andeutung einer Gefahr die Aufmerksamkeit darauf zu richten, und das Verhalten so zu verändern, dass man der Bedrohung ausweichen oder diese beseitigen kann. Angst geht mit der Risikoeinschätzung potentieller Gefahren einher, ist mit Unsicherheit in Erwartung der Bedrohung verbunden, wird eher durch allgemeine, als durch klare Hinweise ausgelöst, und kennzeichnet sich durch einen diffusen Zustand der Verzweiflung mit Symptomen wie Übererregung und gegenstandslosen Sorgen. Angstpatienten neigen dazu, gefahrenbezogenen Hinweisen eine erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken, und unklare emotionale Reize als Bedrohung einzustufen. Weiters können neutrale oder leicht aversive Reize wie Spinnen oder unerwartete Geräusche zu starker Übererregtheit und emotionaler Notlage führen. Diesen Tendenzen liegt wahrscheinlich ein Ausweichverhalten zu Grunde, wie zum Beispiel das Vermeiden sozialer Kontakte, dem Kardinalsymptom von Angststörungen. Letztere werden in fünf Untergruppen eingeteilt:

Generalisierte Angststörungen, Panikattacken, Zwangsstörungen, soziale Phobien und posttraumatische Belastungsstörungen.

GABAerge Neuronen, vor allem in der Amygdala, spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und Beseitigung der Angst. So wurde vor kurzem bei Angstpatienten über eine verstärkte Aktivierung der Amygdala und Hypoaktivierung der orbitofrontalen und medialen präfrontalen Kortex berichtet. Und während die Verstärkung der Inhibition an GABA_A-Rezeptoren, welche die α_2 - oder α_3 -Untereinheit enthalten, durch Agonisten anxiolytisch wirkt, ist die Verringerung der GABAergen Transmission, wie etwa durch partielle inverse Agonisten an der Benzodiazepin-Bindungsstelle, angstauslösend. Weiters konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem partiellen Defizit an GABA_A-Rezeptoren ängstlicher sind und dass auch bei Panikstörungen, posttraumatischen

Belastungsstörungen und Depressionen eine mangelhafte Expression dieser Rezeptoren vorliegt (Möhler, 2012).

Die Depression ist eine komplexe und heterogene Erkrankung mit ungeklärter Pathogenese und einer großen Palette an Symptomen. Dazu gehören eine depressive Stimmungslage, die Unfähigkeit Freude und Lust zu empfinden, Schlafstörungen, Konzentrationsstörungen, Appetit- und Gewichtsveränderungen, Ermüdungserscheinungen, Unentschlossenheit, verlorenes Selbstwertgefühl, Schwarzmalerei, Todesgedanken und Suizidgefährdung. Mit einer Lebenszeitprävalenz von 17% in den USA zählen Depressionen zu den größten Problemen im Gesundheitswesen.

Auch Depressionen werden mit Fehlfunktionen der präfrontalen Kortex und Amygdala in Verbindung gebracht. Zwischen Angststörungen und Depressionen gibt es erhebliche Überschneidungen, häufig ein gemeinsames Auftreten und eine hohe Komorbidität. Der wesentlichste Fakt, dass Angst und Depressionen auf die selben medikamentösen Behandlungen ansprechen, untermauert die Möglichkeit gemeinsamer neuronaler Dysfunktionen. Zu diesen Substanzen gehören unter anderem Selektive-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs), Buspiron und glutamaterge Arzneistoffe wie Ketamin und Riluzol (Möhler, 2012; Rudolph and Möhler, 2014).

Modulatoren des GABA_A-Rezeptors wie Alprazolam und Adinazolam rufen, ähnlich wie die häufig verschriebenen Antidepressiva antidepressive Effekte hervor, allerdings innerhalb der ersten beiden Wochen der Behandlung. Eszopiclon, ein positiv allosterischer Modulator des GABA_A-Rezeptors, wird bei der Therapie von Schlafstörungen eingesetzt. Bei Patienten mit einer Komorbidität von Depression und Schlafstörung führte eine Eszopiclon/Fluoxetin Kotherapie nicht nur zu Schlafverbesserungen, sondern auch zu einem schnelleren Eintritt und einer Verstärkung der antidepressiven Wirkung. Weitere Studien in Tiermodellen könnten zeigen, ob nichtsedierende α_2/α_3 -selektive positiv allosterische Modulatoren schnellwirkende Antidepressiva sein könnten (Rudolph and Möhler, 2014).

1.3.2. Schlafstörungen

Es ist eine alltägliche Erfahrung, dass Schlaf essentiell für die Beseitigung von Müdigkeit ist und damit eine erholsame Wirkung hat. Schlechte Schlafqualität, typisch für Schlafstörungen, hat viele unerwünschte Wirkungen auf das tägliche Leben (Winsky-Sommerer, 2009). Schlafstörungen haben eine hohe Prävalenz, in den USA sind circa 35% der Bevölkerung davon betroffen (Chokroverty, 2010; Winsky-Sommerer, 2009). Zu den epidemiologischen Faktoren gehören hohes Alter, weibliches Geschlecht, niedriger Bildungsgrad und sozioökonomischer Status, Stress, Depression, Angst, Alkohol- und Drogenmissbrauch

(Chokroverty, 2010). Schlafstörungen werden definiert durch Beschwerden über gestörten Schlaf trotz ausreichender Schlafmöglichkeiten und können sich aus einem oder mehreren der folgenden Charakteristika zusammensetzen: Probleme beim Einschlafen oder Durchschlafen, zu frühes Aufwachen und ein nicht erholsamer Schlaf. Es wird angenommen dass der Insomnie eine Übererregung zu Grunde liegt, welche eine Beeinträchtigung der Schlafregulierung widerspiegeln könnte (Winsky-Sommerer, 2009).

Während unzählige Gehirnregionen an Erregungen beteiligt sind, werden nur relativ wenige bei der Initiation des Schlafes aktiviert. Eine hier nennenswerte Region wäre das ventrolaterale präoptische Areal (VLPO) des Hypothalamus. Die VLPO-Neuronen exprimieren die Neurotransmitter GABA und Galanin, welche im Schlaf die Erregungszentren im Gehirn hemmen. Im Gegensatz dazu resultiert Wachheit aus der Inhibition des VLPO durch die erregungsfördernden Nuclei. Dieses wechselseitige Hemmsystem kann als „Flip-Flop“-Schalter betrachtet werden, der scharfe Übergänge zwischen Bewusstseinszuständen herbeiführen kann.

Die sedierenden Effekte der GABA_A-Rezeptor-Aktivierung werden vermutlich durch α_1 -enthaltende Rezeptor Subtypen vermittelt. Da diese allerdings keine Veränderungen im Schlaf-Elektroenzephalogramm (EEG) herbeiführen, wird angenommen, dass α_1 -Subtypen mehr an der Sedierung, als am Schlaf beteiligt sind. Hypnotische Effekte werden auch mit Aktivität an α_2 -Subtypen in Verbindung gebracht, welche in Hypothalamus und Kortex lokalisiert und wichtig für den Umschaltmechanismus zwischen Schlaf und Wachheit sind. Niedrigwelliger Schlaf wird durch niedrigfrequente Delta-Wellen und hochfrequente Spindel/Sigma-Wellen, die aus dem Thalamus stammen, charakterisiert. Thalamische Neuronen etablieren einen niedrigwelligen Rhythmus. α_2 -knockout-Mäuse demonstrierten, dass die α_2 -Untereinheit verantwortlich ist für die Vermittlung von Delta EEG-Aktivität im non-rapid eye movement (NREM) Schlaf und Theta-Aktivität im rapid eye movement (REM) Schlaf. Von besonderer Bedeutung für den Schlaf ist die spezielle Verteilung der α_3 -Untereinheit im Thalamus, wo sie die GABA_A-Hemmung im retikulären Nukleus vermittelt. Diese Region kontrolliert thalamo-kortikale Oszillationen, die wichtig für die Schlafregulierung sind (Nutt and Stahl, 2010).

Die Pharmakologie spielt eine wichtige Rolle bei der Therapie der Insomnie, mit mehreren Transmitter- und Peptidsystemen, einschließlich der GABAergen, Serotoninerger, Histaminergen und Hypokretinerger (Orexinergen) Systeme, als Target. In veralteten und aktuellen Therapien dominieren sedierend-hypnotische Arzneistoffe die an GABA_A-Rezeptoren wirken, wie etwa die traditionellen Benzodiazepine und die Nicht-Benzodiazepine, die auch als Z-Medikamente bezeichnet werden (Zolpidem, Zaleplon, Zopiclon und Eszopiclon) (Winsky-Sommerer, 2009). Diese medikamentösen Behandlungen können notwendig sein, um die Einschlafzeit zu verringern, die Durchschlafzeit zu erhöhen

und die Schlafqualität zu verbessern. Außerdem sollten sie ein normales Aufwachen ermöglichen, ohne anschließende Beeinträchtigung der Tagesfunktionen und ein geringes Abhängigkeitsrisiko aufweisen.

Insomnie gilt als Risikofaktor für Depressionen und Angststörungen und dementsprechend berichten 80% der Patienten über komorbide psychiatrische Symptome. Daher ist es für diese Patienten wünschenswert, dass Hypnotika, Antidepressiva und/oder Anxiolytika optimal aufeinander abgestimmt werden (Nutt and Stahl, 2010).

1.3.3. Epilepsie

Als epileptische Anfälle bezeichnet man anfallsartige, hypersynchrone, vorübergehende elektrische Entladungen im Gehirn infolge zur starker Erregung oder zu geringer Hemmung im betroffenen Areal (Treiman, 2001).

Epilepsie wird diagnostiziert, sobald eine Person zwei oder mehrere unprovokierte Krampfanfälle erlebt hat. Sie betrifft 0,5-1% der Weltbevölkerung und ist damit eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Vermutlich haben viele Epilepsiesyndrome eine genetische Komponente. Sie variieren in ihrem Schweregrad von der relativ gutartigen Absence-Epilepsie bei Kindern bis zu schwerwiegenden Epilepsieformen wie dem Dravet-Syndrom. Wenn bereits mehrere Familienmitglieder fiebrige oder fieberfreie Krampfanfälle oder andere generalisierte Epilepsiesyndrome erlitten haben, spricht man von generalisierter Epilepsie mit fiebrigen Anfällen plus (GEFS+). Auch wenn wahrscheinlich die meisten genetischen Epilepsiesyndrome mit komplexer polygenetischer Vererbung in Zusammenhang stehen, konnte gezeigt werden, dass auch monogenetische Mutationen transmembranärer Ionenkanäle Epilepsie hervorrufen können.

Man kann hier 4 Arten von Mutationen voneinander unterscheiden:

- 1) Missense-Mutationen in codierenden Sequenzen
- 2) Nonsense-Mutationen in codierenden Sequenzen
- 3) Frameshift-Mutationen in codierenden Sequenzen
- 4) Mutationen in nichtcodierenden Sequenzen (Macdonald et al., 2010)

Diese Mutationen verändern die Zusammensetzung und Funktion der GABA_A-Rezeptoren dahingehend, dass sie die exzitatorische Neurotransmission erhöhen oder die inhibitorische Neurotransmission reduzieren und dadurch zu einer Übererregbarkeit im Gehirn führen. Dies erklärt die erhöhte Krampfanfälligkeit, sowohl akut beim Status Epilepticus als auch bei chronischer Epilepsie (Greenfield, 2013; Macdonald et al., 2010).

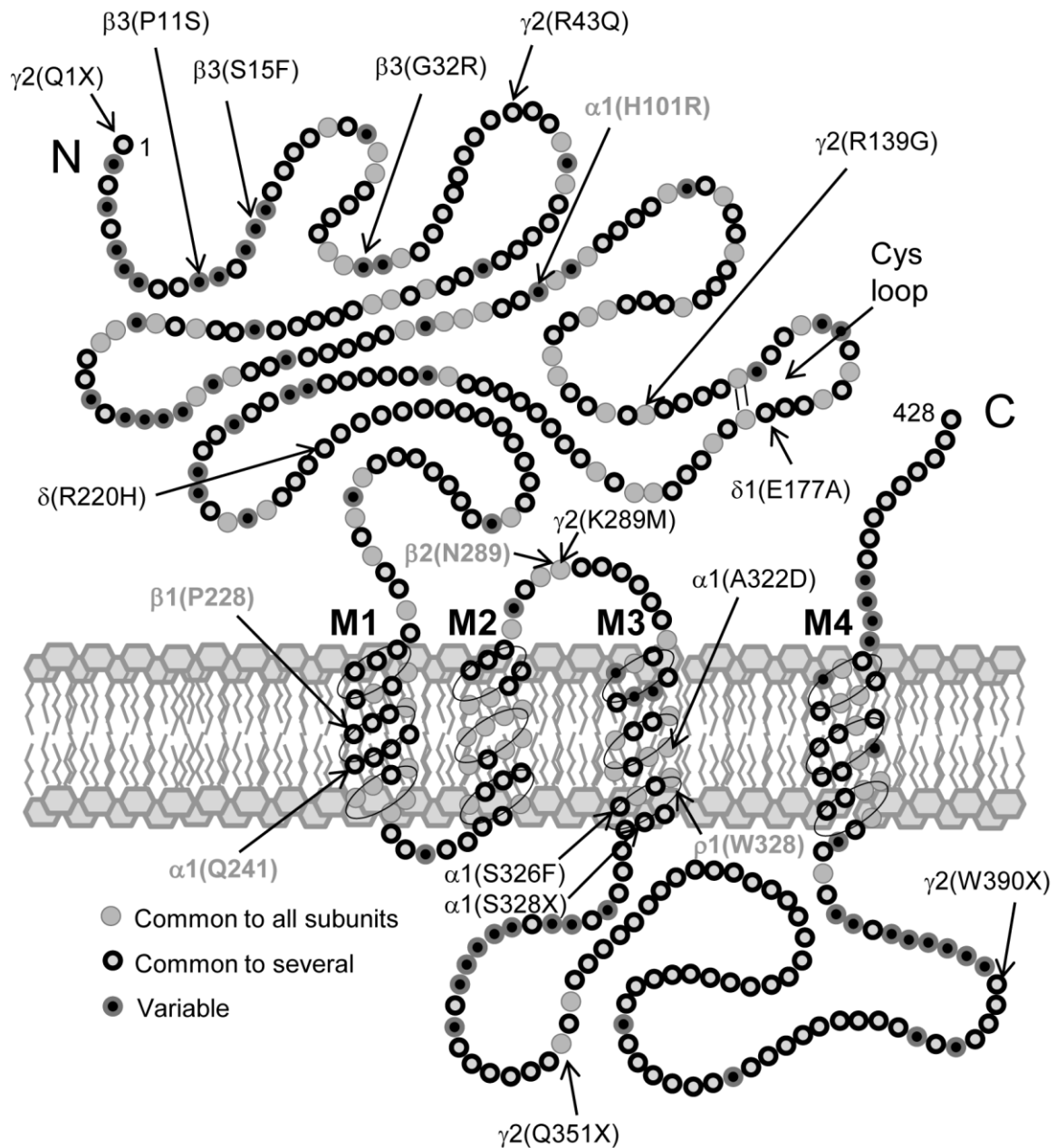


Abbildung 17 zeigt Mutationen an GABA_A-Rezeptor Untereinheiten, die mit Epilepsie assoziiert werden (schwarz) und Mutationen an Bindungsstellen von Antikonvulsiva (grau) (Greenfield, 2013).

Mutation/Variante; Originalquelle	¹ GES	Strukturelle Besonderheiten	GABA _A -Rezeptor-Dysfunktion
²CAE or ³JME (α₁/β₃-Untereinheit) - 4 Missense, 1 Promotor und 1 Frameshift Mutation			
β ₃ (P11S) (Tanaka et al., 2008)	CAE	Missense-Mutation im Signalpeptid	abnormale N-verknüpfte Glykosylierung und reduzierte Ströme
β ₃ (S15F) (Tanaka et al., 2008)	CAE	Missense-Mutation im Signalpeptid	abnormale N-verknüpfte Glykosylierung und reduzierte Ströme
β ₃ (G32R) (Tanaka et al., 2008)	CAE	Missense-Mutation am N-Terminus	abnormale N-verknüpfte Glykosylierung und reduzierte Ströme
GABRB3 haplotype 2 (Urak et al., 2006)	CAE	Exon 1a Haplotyp 2 Promotor	beeinträchtigte Bindung des N-Oct-3 Transkriptionsaktivators
α ₁ (975delC, S326fs328X) (Maljevic et al, 2006)	CAE	Frameshift-Mutation und ⁴ PTC in M3	⁵ NMD infolge ⁶ ERAD des Untereinheiten- Proteins
α ₁ (A322D) (Cossette et al, 2002)	JME	Missense-Mutation in M3	Missfaltung, verminderte Expression, reduzierte Ströme
⁶FS +/- CAE (γ₂-Untereinheit) - 2 Funktionelle Missense und 1 nichtfunktionelle Nonsense Mutation			
γ ₂ (R82Q) (Wallace et al., 2001)	FS	Missense-Mutation am N-Terminus	beeinträchtigte Oligomerisierung, ER- Retention, verminderte Oberflächen- expression, reduzierte Ströme
γ ₂ (R177G) (Audenaert et al, 2006)	FS	Missense-Mutation am N-Terminus	veränderte Strom-Kinetik
GABRG2(IVS6+2T→G) (Kananura et al., 2002)	FS/ CAE	Mutation der Spleiß- Donor-Stelle von Intron 6	verursacht vermutlich ein PTC an der 5./7. Exon-Junction
GEFS und/oder DS (γ₂/δ-Untereinheit) - 4 funktionelle Missense und 3 nichtfunktionelle Nonsense Mutationen			
γ ₂ (K328M) (Baulac et al, 2001)	GEFS+	Missense-Mutation in Loop M2-M3	verminderte Kanalöffnungszeiten, beschleunigte Deaktivierung der Ströme
γ ₂ (Q390X) (Harkin et al., 2002)	GEFS+/ DS	Nonsense-Mutation in Loop M3/M4	ER-Retention, dominante negative Reduktion von Wildtyp-Rezeptoren, reduzierte Ströme
γ ₂ (W429X) (Sun et al., 2008)	GEFS+	Nonsense-Mutation in Loop M3/M4	unbekannt, vermutlich unbeeinflusst von NMD, daher Produktion verkürzter Peptide
δ(E177A) (Dibbens et al, 2004)	GEFS+	Missense-Mutation am N-Terminus	reduzierte Ströme, verminderte Kanalöffnungszeiten
δ(R220C) (Dibbens et al, 2004)	GEFS+	Missense-Mutation am N-Terminus	reduzierte Ströme, verminderte Kanalöffnungszeiten
γ ₂ (Q40X) (Hirose, 2006)	DS	Nonsense-Mutation am N-Terminus	unbekannt, führt wahrscheinlich zu NMD

Tabelle 2: Mutationen von GABA_A-Rezeptor assoziiert mit unterschiedlichen Formen der Epilepsie (adaptiert nach Macdonald et al., 2012)

¹GES: genetisches Epilepsiesyndrom

²CAE: childhood absence epilepsy (Absence-Epilepsie des Kindesalters)

³JME: juvenile myoclonic epilepsy (jugendliche myoklonale Epilepsie)

⁴PTC: premature terminal codon (vorzeitiges Stoppcodon)

⁵NMD: Nonsense-mediated mRNA decay (Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau)

⁶ERAD: Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation

⁷FS: febrile seizures (fiebrige Anfälle)

1.3.4. Schizophrenie

Die Schizophrenie, eine verheerende Krankheit, unter der weltweit 0,5-1% der Bevölkerung leidet, wird durch positive, negative und kognitive Symptome charakterisiert. Unter positiven Symptomen versteht man eine veränderte Realitätswahrnehmung mit Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Verwirrtheit. Negative Symptome sind erkennbar an der Abnahme von emotionalem Ausdruck, Motivation und sozialen Fähigkeiten. Kognitive Symptome, die sich durch Verschlechterungen der Gedächtnisleistungen und exekutiven Funktionen bemerkbar machen, sind das Hauptmerkmal der Schizophrenie. Die ersten Symptome treten am Ende der Pubertät oder im frühen Erwachsenenalter auf und den meisten Patienten wiederfährt ein lebenslanger Krankheitsverlauf mit Schwierigkeiten bezüglich Arbeit, persönlichen Beziehungen und Selbstsorge. Man geht davon aus, dass Schizophrenie eine neurologische Entwicklungsstörung ist, die durch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse wie jugendlichem Cannabiskonsum verursacht wird (Curley and Lewis, 2012).

Seit den frühen 1970er Jahren deuten zahlreiche Hinweise darauf hin, dass GABAerge Defizite eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielen. Die reduzierte Expression von GAD67 und die damit einhergehend verminderte Biosynthese von GABA führt zu verringerter GABAerger Neurotransmission und zu kompensatorischen Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Expression. Die Expression von α_5 -Untereinheiten synaptischer GABA_A-Rezeptoren wird erhöht (aber unzureichend) und die Expression von extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren der präfrontalen Kortex, welche die δ -Untereinheit enthalten, wird vermindert (Hines et al., 2012; Rudolph and Möhler, 2014). Weiters kommt es durch ein Defizit in der glutamatergen Aktivierung von GABAergen Interneuronen in der präfrontalen Kortex zu einer Upregulation der α_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors im AIS (axon initial segment). TPA023, ein partieller, α_2/α_3 -selektiver positiver allosterischer Modulator des GABA_A-Rezeptors, reduzierte bei Rhesusaffen Defizite in der Gedächtnisfunktion und erhöhte die frontale Gamma-Band-Aktivität während kognitiver Aufgaben bei Schizophrenie-Patienten (Rudolph and Möhler, 2014). Die potentielle Beteiligung der GABAergen Hemmung bei sensomotorischem Gating und kognitiver Funktion wird auch dadurch unterstützt, dass α_3 -knockout-Mäuse und Mäuse mit reduzierter Expression von α_5 im Hippokampus eine mangelhafte Präpulsinhibition des akustischen Schreckreflexes zeigen (Hines et al., 2012; Rudolph and Möhler, 2014). Die Präpulsinhibition ist ein Maß für das sensomotorische Gating. Wenn einem Schreckreiz („pulse“) ein Präpuls von geringerer Intensität vorausgeht, wird die Schreckreaktion bzw. der Schreckreflex abgeschwächt (Schwabe et al., 2007). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigt der α_5 -selektive Agonist SH-053-2_F-R-CH3 therapeutische Wirksamkeit in einem Tiermodell,

bei dem durch Methylazoxymethanol-acetat (MAM) Schizophrenie entwickelt wird, indem er die dopaminerge Hyperaktivierung rückgängig macht (Hines et al., 2012; Rudolph and Möhler, 2014).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Agonisten an α_2 -, α_3 - und α_5 -GABA_A-Rezeptoren sowohl antipsychotische (über α_3 und α_5) als auch kognitionsfördernde (über α_2) Effekte haben könnten, ohne sedierende (über α_1) Nebenwirkungen. Rückblickend ist es bemerkenswert, dass der partielle, nichtselektive positive allosterische Modulator Bretazenil, der ursprünglich als nichtsedierendes Anxiolytikum entwickelt wurde, als Monotherapie bei 44% der Patienten mit akuten schizophrenen Schüben wirksam war (Rudolph and Möhler, 2014).

1.4. Der GABA_B-Rezeptor

Inhibitorische GABAerge Synapsen können nicht nur ionotrope GABA_A-Rezeptoren, sondern auch metabotrope GABA_B-Rezeptoren enthalten. Metabotrope Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, welche das extrazelluläre Signal in eine intrazelluläre Antwort umwandeln. Im Gegensatz zu den ionotropen Rezeptoren bewirken metabotrope Rezeptoren langsamere, länger anhaltende postsynaptische Effekte. G-Proteine können die Eigenschaften dieser Ionenkanäle direkt verändern oder intrazelluläre Second-Messenger-Wege aktivieren, die indirekt die Kanalaktivität modulieren. Zu den metabotropen Rezeptoren gehören metabotrope Glutamat-Rezeptoren, muscarinische Acetylcholin-Rezeptoren, GABA_B-Rezeptoren und die meisten Serotonin-Rezeptoren, so wie auch Rezeptoren für Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Dopamin, Neuropeptide und Endocannabinoide (D'Hulst et al., 2009).

Über GABA_B-Rezeptoren wurde erstmals im Jahr 1980 berichtet (Froestl, 2011). Sie sind nicht nur an exzitatorischen, sondern auch an inhibitorischen Synapsen, sowohl prä- als auch postsynaptisch, in nahezu allen Teilen des Gehirns lokalisiert (Benke et al., 2012; Chalifoux and Carter, 2011).

Im Gegensatz zum GABA_A-Rezeptor mit seinen 19 verschiedenen Untereinheiten, existieren hier mit dem GABA_{B1} und GABA_{B2} nur zwei unterschiedliche Untereinheiten. Allerdings codieren drei Gene für den GABA_B-Rezeptor (Chalifoux and Carter, 2011; Rudolph and Knoflach, 2011). Von der B1-Untereinheit gibt es nämlich auf Grund von Gen-Splicing die beiden Isoformen B1a und B1b, welche sich in N-terminalen Regionen unterscheiden. Als Heterodimer benötigt ein funktionsfähiger GABA_B-Rezeptor sowohl die GABA_{B1}- als auch die GABA_{B2}-Untereinheit (Benke et al., 2012; Chalifoux and Carter, 2011). Während Erstere für die Bindung von GABA verantwortlich ist, übernimmt Letztere die G-Protein-Aktivierung und die Bindung von allosterischen Modulatoren. So führt die Bindung von GABA an den GABA_B-Rezeptor zur Dissoziation des G-Proteins in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit verursacht einerseits präsynaptisch die Hemmung spannungsabhängiger P/Q und N-Typ Calciumkanäle, und andererseits postsynaptisch die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten, einwärtsgleichgerichteten Kaliumkanälen (GIRK) (Benke et al., 2012).

Im Gegensatz dazu inhibiert die α -Untereinheit die Adenylatcyclase und senkt hierdurch den intrazellulären cAMP-Spiegel (cyclisches Adenosinmonophosphat). Dies führt zu einer verminderten Aktivität der Proteinkinase A (PKA), die im Regelfall die Permeabilität für Calciumionen erhöht, und somit zu einer Reduktion der NMDA-Rezeptor vermittelten Calciumströme. Alle jene Mechanismen rufen die Hyperpolarisation der Zelle hervor (Benke et al., 2012; Chalifoux and Carter, 2011).

2. Problemstellung und Zielsetzung

Fehlfunktionen von GABA_A-Rezeptoren können zu verschiedensten neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen führen (D'Hulst et al., 2009; Hines et al., 2012). Angststörungen werden am häufigsten diagnostiziert, stellen chronische und beeinträchtigende Erkrankungen dar und verursachen enorme Kosten für Patienten und Gesundheitssysteme. Benzodiazepine besitzen eine hohe anxiolytische Wirksamkeit, können allerdings bei Langzeitanwendung zu Nebenwirkungen wie Sedierung, Gedächtnisbeeinträchtigungen, Toleranz und Abhängigkeit führen (Griebel and Holmes, 2013). Daher werden bevorzugt selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs) eingesetzt, die aber erst nach frühestens 4 Wochen zu einem Rückgang der Symptome und davor sogar zu einem initialen Anstieg der Symptome führen können. Deshalb werden zur akuten Behandlung häufig Benzodiazepine verschrieben (Skolnick, 2012). Seitdem die spezifischen Funktionen der jeweiligen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bekannt sind, wird an Untereinheiten-selektiven Wirkstoffen geforscht, die die schnelle und starke anxiolytische Wirkung der Benzodiazepine besitzen, aber frei von deren Nebenwirkungen sein sollten (Rudolph and Knoflach, 2011; Rudolph and Möhler, 2006; Skolnick, 2012).

Vor einigen Jahren wurde am *Department für Pharmakologie und Toxikologie* der Universität Wien ein Naturstoff (EK-0) als $\beta_{2/3}$ -selektiver Modulator des GABA_A-Rezeptors identifiziert, dem eine anxiolytische Wirkung ohne Sedierung nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten nun ausgewählte Derivate von EK-0 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

Zunächst sollte *in vitro* der GABA_A-Rezeptor-Subtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und GABA-Konzentrations-Wirkungskurven erstellt werden und die konzentrationsabhängige Modulation (Potenzierung) von GABA-induzierten Chloridströmen (I_{GABA}) durch die ausgewählten Derivate EK-1, EK-2, EK-3 und EK-4 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptoren mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht und anhand der gewonnenen Daten die Wirksamkeit (E_{max}) und Wirkstärke (EC_{50}) bestimmt werden.

Danach sollten *in vivo* mittels verhaltens-pharmakologischer Standardtests auch dosisabhängige Effekte von EK-1, EK-3 und zwei weiteren Derivaten EK-5 und EK-6 im Vergleich zur Kontroll- und Diazepamgruppe auf primär die lokomotorische Aktivität und sekundär das angstbezogene Verhalten im Open-Field-Test beziehungsweise potentiell angstreduzierende Effekte im Light/Dark-Choice-Test analysiert werden.

3. Methoden

Die experimentellen Methoden wurden bereits in am *Department für Pharmakologie und Toxikologie*, unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. med. Steffen Hering, durchgeführten Diplomarbeiten beschrieben und werden hier geringfügig adaptiert zusammengefasst (siehe Diplomarbeit Mag. Denise Luger, „Untersuchung verschiedener GABA_A-Liganden am Tiermodell in Bezug auf Anxiolyse und Sedierung“, 2012; Mag. Susanne Riedler, „Charakterisierung der *in vivo* Wirkung eines Naturstoffes mithilfe verhaltenspharmakologischer Tests“, 2010; Mag. Helga Dobernig, „Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Effekte ausgewählter Naturstoffderivate im Tiermodell“, 2013; Mag. Sarah Maria Trattinig „Beta-Untereinheiten abhängige Modulation des GABA_A Rezeptors durch einen Naturstoff“, 2009).

3.1. *In vitro* Untersuchungen

Zur Untersuchung von elektrischen Membranvorgängen stehen in der Elektrophysiologie verschiedene Testsysteme zur Verfügung. Für meine Untersuchungen wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt. Diese Technik ermöglicht es, transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen.

Es wurden rekombinante GABA_A-Rezeptoren mit der Untereinheiten-Kombination $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. *Xenopus* Oozyten sind heute ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren.

Gurdon et al. entdeckten schon 1971 die Fähigkeit funktioneller Expression exogener mRNA-Spezies durch Injektion der mRNA in das Zytoplasma der Froschoozyten.

3.1.1. Verwendete Lösungen

Zur Präparation der Oozyten wurde OR2 (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES; pH = 7,5 (1M NaOH)) verwendet (Bianchi and Driscoll, 2006).

Als Standardlösung zur Verdünnung und als physiologisches Medium für die Oozyten wurde ND96 verwendet (90mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH = 7,4 (1M NaOH)). Die Mikroelektroden wurden mit 2M KCl befüllt (Bianchi and Driscoll, 2006). Von den zu untersuchenden Naturstoff-Derivaten (EK-1, EK-2, EK-3 und EK-4) wurde eine Stammlösung (in 100% DMSO) hergestellt (Konzentration 100 mM). Anschließend wurde diese Stammlösung mit ND96 verdünnt, um Konzentrationen von 1 µM-500 µM (1 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM) zu erhalten. Dimethylsulfonoxid (DMSO) war in

allen Lösungen in einer Maximalkonzentration von 0,3 % enthalten. Die 1 mM GABA-Lösung (in ND96) wurde ebenfalls an jedem Versuchstag frisch zubereitet (5,15 mg GABA in 50 ml ND96), und mit ND96 auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Die Testlösungen wurden nach Abschluss der Messungen an einem Tag verworfen.

3.1.2. Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden 15-30 min lang in einer 0,2 %igen Lösung von Tricain (= Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; MS-222) anästhetisiert. Daraufhin wurden die von Follikelgewebe umgebenen Oozyten operativ entnommen, und in eine Petrischale mit OR2-Lösung transferiert.

Nach mechanischer Zerkleinerung des gewonnen Follikelgewebes wurde eine Kollagenase-Lösung (Kollagenase Sigma Typ IA 2mg/ml in OR2) zugesetzt und für 90 Minuten bei 18 °C inkubiert (Bianchi and Driscoll, 2006). Nach dieser enzymatischen Behandlung lagen die Oozyten größtenteils ohne umgebendes Follikelgewebe einzeln vor.

Von großer Bedeutung war ein gründliches Auswaschen der Kollagenase-Lösung mit OR2-Lösung, da in der später zugefügten ND96-Lösung enthaltenes Calcium nachträglich zu einer zellschädigenden Aktivierung von Proteasen führen kann (Bianchi and Driscoll, 2006).

Anschließend wurden die Oozyten in eine Petrischale mit ND96-Lösung transferiert und einige Stunden bei 18°C inkubiert. Die für die Injektion am besten geeigneten Oozyten (Stadium V-VI) mit einem Durchmesser von 1000–1200 µm wurden nach äußerlichen Kriterien mit einer Pasteurpipette selektioniert und weiterverwendet (Bianchi and Driscoll, 2006; Gurdon et al., 1971).



Abbildung 19: Weiblicher *Xenopus laevis* Frosch

(<http://www.ruhr-uni-bochum.de/bc1/forschung/xenopus-projekt.html>, 15.06.2015)

3.1.3. Vorbereitung der cRNA

Poly(A⁺)cRNA-Transkripte ausgehend von linearisierter cDNA wurden in einem pCMV-Vektor kloniert. cRNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodierten, wurden in mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser gelöst.

3.1.4. Injektion der cRNA

Bei der Injektion von cRNA in den Oozyten musste auf ausreichende, mechanische Stabilität geachtet werden, um die Oozyten nicht zu verletzen. Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNAs, die für die verschiedenen Untereinheiten kodieren, im Verhältnis 1:1:10 für den zu untersuchenden Rezeptor $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ gemischt. Etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung wurden mithilfe eines pneumatischen Injektionsgerätes mit einer Glaskapillare in die einzelnen Oozyten injiziert (d.h. bis der Oozyt deutlich sichtbar an Größe zugenommen hatte).

Nach der Injektion wurden die Oozyten für weitere 24 Stunden bei 18° in ND96 + Penicillin 100 U/ml und Streptomycin (100 µg/ml) inkubiert und konnten danach für die Messungen verwendet werden.

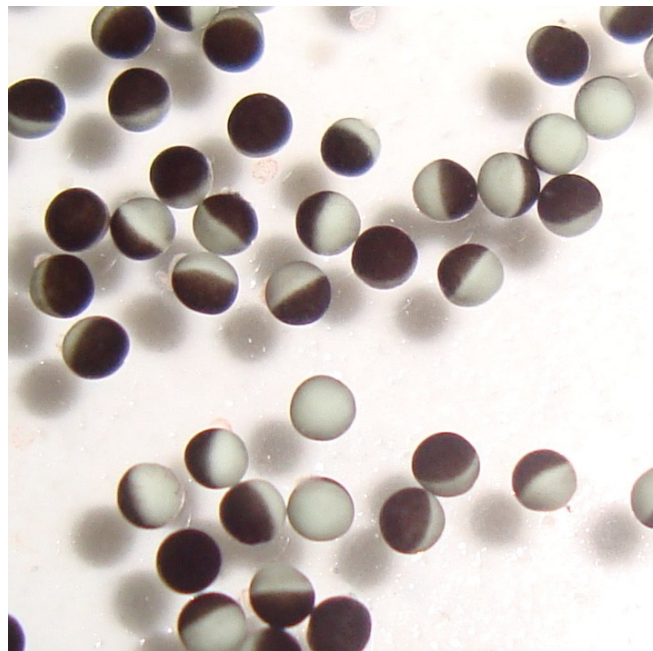


Abbildung 20: *Xenopus laevis* Oozyten im Reifestadium V-VI

(A. Schöffmann, *Department für Pharmakologie und Toxikologie*, Universität Wien, 2013)

3.2.5. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp)

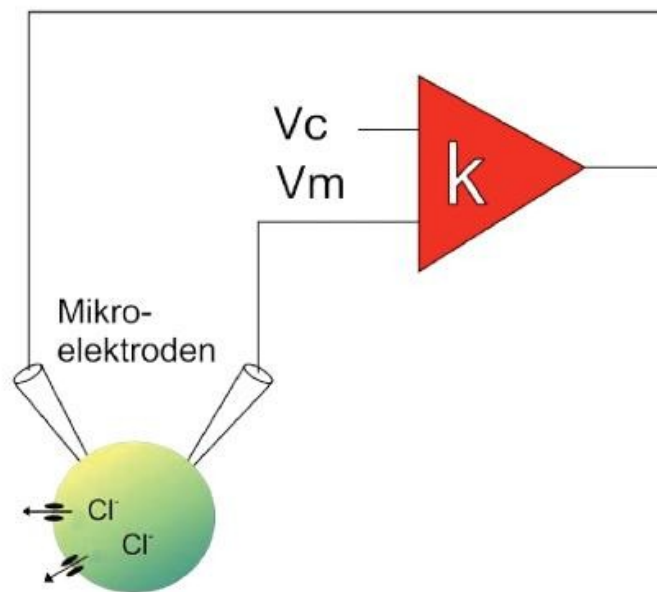


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Messprinzips der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (*Department für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien*)

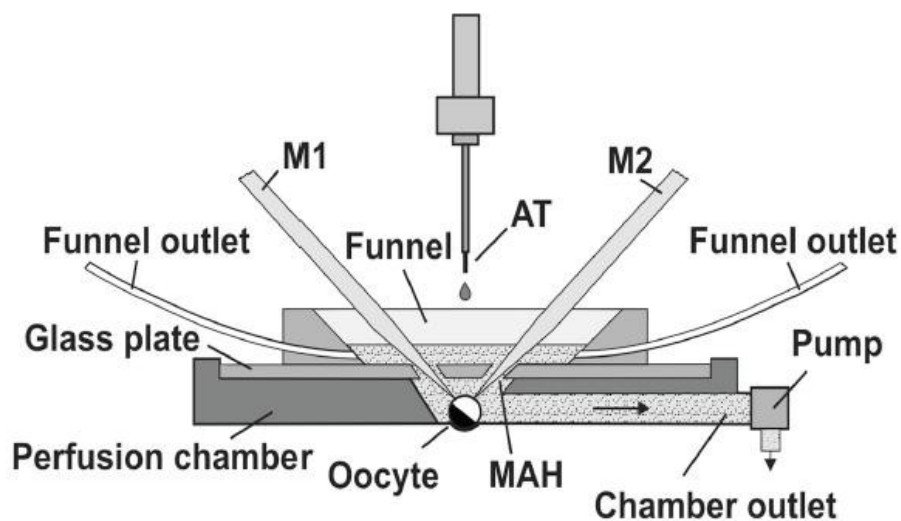


Abbildung 22: Schematischer Aufbau der Perfusionskammer (Baburin et al., 2006)

Die Messungen wurden mit einem modifizierten schnellen Perfusionssystem (Baburin et al., 2006) durchgeführt. In Abbildung 22 ist die verwendete Oozyten-Perfusionskammer schematisch dargestellt. Der Oozyt (oocyte) liegt auf einer zylindrischen Halterung. Die Applikation der Lösungen erfolgt von oben (application tube, AT), gesteuert von einem Roboter (TECAN Miniprep 60), in einen Trichter aus Quarz (funnel), der die Mikroelektroden (M1 und M2) umschließt und auf die Oozytenkammer aufgesetzt ist. Durch Öffnungen (microelectrode access holes, MAH) in der Deckplatte (glass plate) gelangen die

Mikroelektroden zum Oozyten. Die Mikroelektroden werden manuell in den Oozyten eingeführt. Applizierte Volumina werden durch eine Pumpe (pump) des Miniprep 60, die mit einem Ausgang der Kammer (chamber outlet) verbunden ist, entfernt und somit die Perfusion ermöglicht. Eventuelle Restvolumina werden durch am Trichter befestigte Abflüsse (funnel outlet) abgesaugt.

Bei der Applikation einer den liganden-gesteuerten Ionenkanal (LGIC) aktivierenden Substanz kommt es zu einer Öffnung des Kanals und einem selektiven Ionenstrom. Dieser Ionenstrom folgt einem elektrochemischen Gradienten. Das Prinzip dieser Technik ist ein konstant gehaltenes Membranpotential (-70 mV), das die Messung transmembranärer Ionenströme ermöglicht. Cl-Ionen stömen in den Oozyten, es kommt zur intrazellulären Potentialänderung (Bianchi and Driscoll, 2006).

Der Versuchsaufbau besteht aus zwei in den Oozyten insertierten Mikroelektroden, wobei eine Elektrode (potential electrode) das membranäre Potential misst und die zweite Elektrode (current electrode) Strom in den Oozyten injiziert. Zwischengeschaltet ist ein Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC Amplifier), der die Differenz zwischen Haltepotential und tatsächlichem Potential misst. Der Verstärker injiziert über die „current electrode“ die Menge an Strom in den Oozyten, die nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen. Diese Menge wiederum entspricht dem von der Oozytenmembran generierten Ionenstrom und wird gemessen (Bianchi and Driscoll, 2006).

3.2. *In vivo* Untersuchungen

3.2.1. Versuchstiere

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden ausschließlich männliche C57BL/6N Mäuse im Alter von 3 bis 6 Monaten verwendet (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Weibliche Mäuse haben den Nachteil, dass durch den Reproduktionszyklus mit schwankenden Östrogen- und Gestagenspiegeln das Angstverhalten der Weibchen beeinflusst und die Ergebnisse somit verfälscht werden könnten (Gadad et al., 2010). Die Mäuse wurden in Fünfergruppen in Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Weitere Bedingungen im Tierstall waren: Raumtemperatur 23 ± 1 °C, Luftfeuchtigkeit 40 ± 20 % und ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus (Beleuchtung von 07.00 bis 19.00 Uhr).

Die Durchführung der Experimente wurde vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung, in Übereinkunft mit der europäischen Konvention für den Schutz von Wirbeltieren, die für wissenschaftliche und experimentelle Zwecke verwendet werden (ETS 123), genehmigt (Khom et al., 2010).

Am Tag vor der Untersuchung wurde jede Maus markiert und gewogen, um die individuelle zu verabreichende Dosis zu berechnen. Anschließend wurden die Versuchstiere vom Tierstall in den Versuchsraum gebracht, um sich über Nacht an die neue Umgebung gewöhnen zu können.

3.2.2. Injektionslösungen

Herstellung

Zur Herstellung der Injektionslösungen wurden die Testsubstanzen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden 3 % Polysorbat80 und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zugegeben. Die benötigten Injektionslösungen wurden an jedem Versuchstag frisch zubereitet.

Applikation

Um die anderen Tiere nicht zu stören, wurden die Versuchstiere einzeln in einen separaten Raum gebracht, wo ihnen 30 min vor dem Test die jeweils zu untersuchende Substanz, in der gewünschten Dosierung (siehe Kapitel Ergebnisse), intraperitoneal (i.p.) injiziert wurde. Den Kontrollmäusen wurde physiologische Kochsalzlösung i.p. verabreicht.

3.2.3. Verhaltenspharmakologische Tests

Mäuse zeigen eine natürliche Abneigung gegenüber unvertrauter Umgebung, hell ausgeleuchteten Flächen (Bourin and Hascoët, 2003) und offenen Flächen (File, 2001). Wenn ein Tier einer neuen Umgebung ausgesetzt ist, dann entsteht ein Konflikt zwischen der Tendenz zu explorieren und der Tendenz die unvertraute Umgebung zu meiden (Bourin and Hascoët, 2003).

3.2.3.1. Open-Field-Test (OF)

30 min nach i.p. Injektion wurde das Verhalten der Mäuse über einen Zeitraum von 10 min in einer 50 x 50 cm Box, mit Infrarot-Lichtschraken ausgestattet, getestet. Die Lichtintensität wurde auf 150 Lux eingestellt. Nach Empfehlung von EMPReSS (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens; <http://empress.har.mrc.ac.uk>) wurde die Gesamtfläche für die Auswertung in eine Randzone (bis 8 cm von der Wand), ein Zentrum (16 % der Gesamtfläche) und die Fläche zwischen diesen Zonen = Zwischenzone unterteilt (siehe Abbildung 23). Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels des automatischen Trackingsystems ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

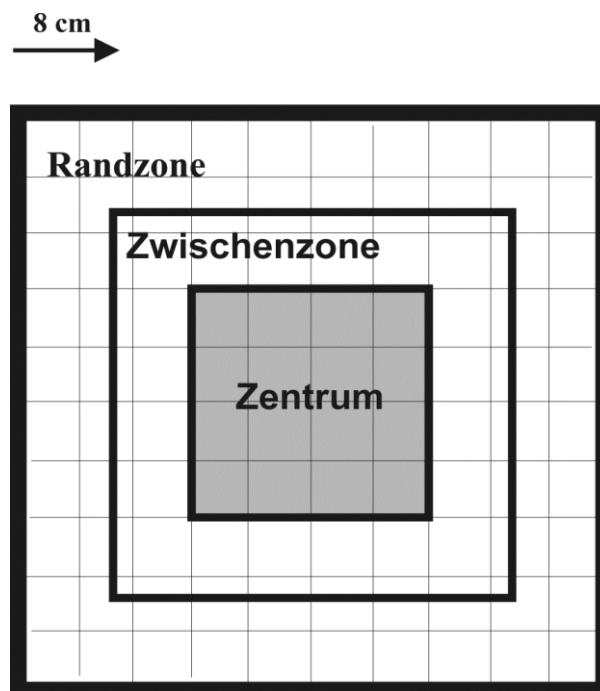


Abbildung 23 Schematische Darstellung des OF mit Einteilung der Fläche in Rand-, Zwischenzone und Zentrum.

3.2.3.2. Light/Dark-Choice-Test (LDT)

Der Light/Dark-Choice-Test ist einer der wichtigsten Tests, der für die Untersuchung des Angstverhaltens von Mäusen entwickelt wurde (File, 2001).

Zur Durchführung des LDT wurde in die mit Infrarot-Lichtschraken ausgestattete 50 x 50 cm Box eine um zwei Drittel kleinere, schwarze Box mit Deckel und einer kleinen Öffnung (Eingang vom hellen ins dunkle Kompartiment) gestellt. Diese Box diente den Mäusen als Versteck. Während des Versuchs wurde das helle Kompartiment mit einer Lichtintensität von 400 Lux ausgeleuchtet. In Abbildung 24 ist die Versuchsanordnung dargestellt. 30 min nach i.p. Injektion der Testlösungen wurden die Tiere einzeln mit dem Gesicht zur Öffnung in Richtung des dunklen Kompartiments gesetzt und das Verhalten über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet. Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels des automatischen Trackingsystems ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

Die gesamte Versuchsanordnung wurde vor und nach jedem Versuchstier gründlich mit 30 % Ethanol gereinigt, zurückgelassener Urin oder Fäzes wurden dokumentiert und entfernt.



Abbildung 24: Versuchsanordnung des LDT

3.2.3.3. Statistische Analyse der Daten

Statistische Signifikanz wurde mittels Einweg-ANOVA (Origin MicroCal) ermittelt. p-Werte <0,05 gelten als statistisch signifikant. Alle Werte werden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Modulation von $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ Rezeptoren durch ausgewählte Derivate von EK-0

Da die Wirkung dieser GABA_A-Rezeptor-Modulatoren von der GABA-Konzentration abhängig ist, wurde - um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten – jedes Experiment bei konstanter und geringer GABA-EC₃₋₇-Konzentration gemessen. Diese EC₃₋₇ (effective concentration 3-7) musste im Vorfeld ermittelt werden und erzeugte einen Kontrollstrom ($I_{\text{Kontrolle}}$), der 3-7% des Maximalstroms (I_{max} bei 1000 μM GABA) hervorrief.

4.1.1. Auswertung

Für die Berechnung der EC₃₋₇ wurde nachstehende Formel verwendet:

$$E(\%) = I_{\text{GABA}} * 100 / I_{\text{max}}$$

Die Potenzierung von I_{GABA} durch die jeweiligen Substanzen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$I_{\text{GABA}}(\%) = (I_{\text{potenziert}} * 100 / I_{\text{Kontrolle}}) - 100$$

Die dadurch erhaltenen Werte wurden im Softwareprogramm *Origin* in ein halblogarithmisches Koordinatensystem eingetragen. Durch diese Datenpunkte wurde eine sigmoidale Kurve nach der Hill-Gleichung gelegt und anhand dieser Kurven wurden dann die Parameter E_{max} , EC_{50} und n_H ermittelt.

E_{max} ... Wirksamkeit (maximale Potenzierung von I_{GABA})

EC_{50} ... Wirkstärke (jene Konzentration, die 50 % des maximalen Effekts auslöst)

n_H ... Hill-Koeffizient

n ... Anzahl der Experimente

Die auf dieser Seite geschilderten Vorgänge wurden bereits in am *Department für Pharmakologie und Toxikologie*, unter der Betreuung von Univ. Prof. Dr. med. Steffen Hering, durchgeführten Diplomarbeiten beschrieben und wurden auch hier nur geringfügig adaptiert zusammengefasst (siehe Diplomarbeit Mag. Verena Hiebl, „*In vitro* Untersuchung der möglichen beta-selektiven Modulation von GABA_A Rezeptoren durch Piperin-Derivate“, 2013 und Mag. Lisa Holler, „Untersuchung der Subtyp-selektiven Interaktion von ausgewählten Naturstoffderivaten mit GABA_A Rezeptoren“, 2013).

4.1.2. GABA-Konzentrations-Wirkungskurve

Die Applikation ansteigender GABA-Konzentrationen am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -GABA_A-Rezeptor induzierte Chloridströme, deren Maximum bei 1000 μM erreicht wurde. Die E_{max} betrug 99 ± 2 ($n = 4$), die EC_{50} $36,9 \pm 3,3 \mu\text{M}$ und der Hill-Koeffizient (n_H) lag bei $1,6 \pm 0,1$.

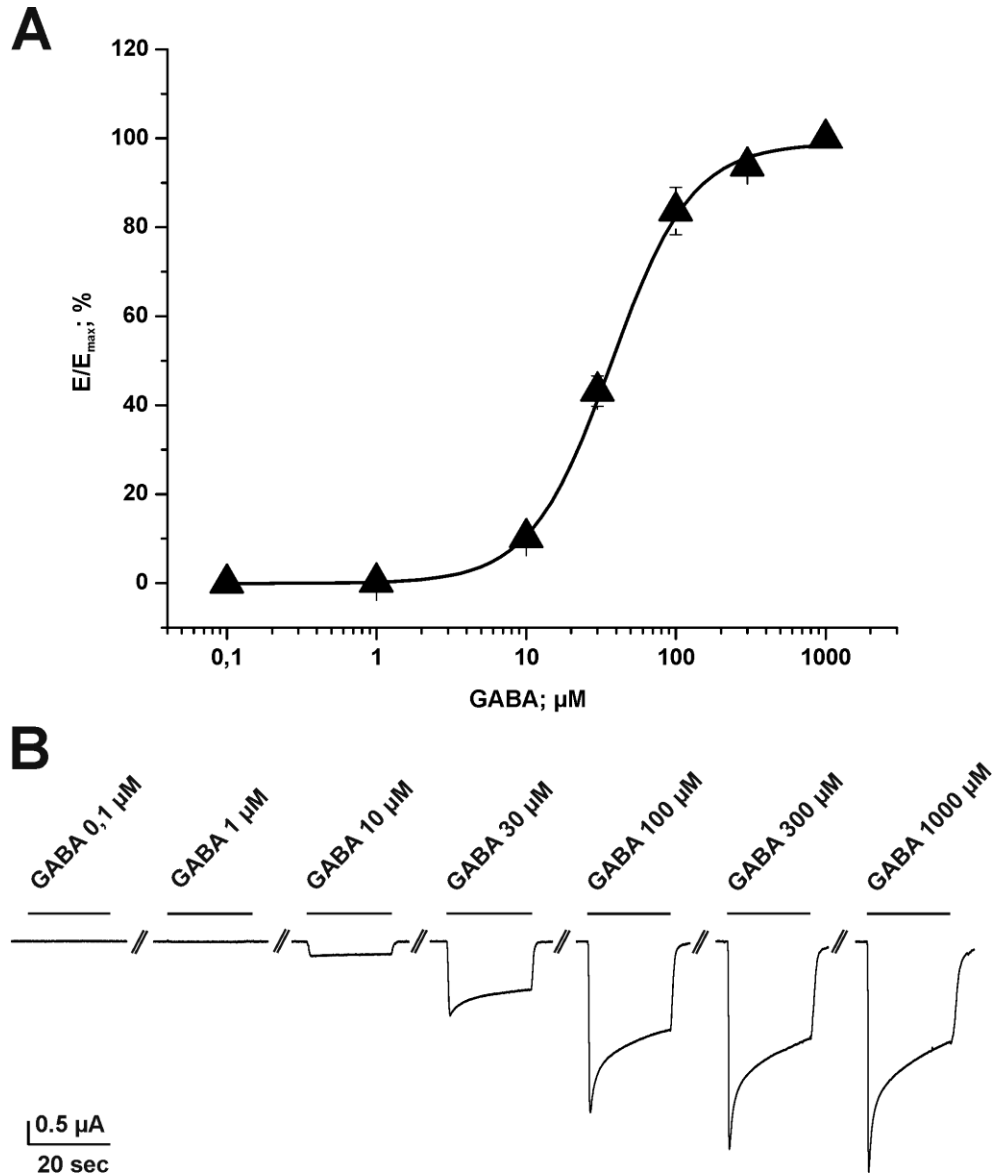


Abbildung 25: (A) Konzentrations-Wirkungskurve von GABA an GABA_A-Rezeptoren bestehend aus $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$. Bei jedem Datenpunkt handelt es sich um einen Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) von 4 Experimenten an Oozyten von 2 verschiedenen Fröschen. (B) Abbildung typischer GABA-induzierter Chloridströme bei den angegebenen Konzentrationen durch den GABA_A-Rezeptor-Subtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$.

4.1.3. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptor durch EK-1

Wie in Abbildung 26 gezeigt, führte die Co-Applikation einer GABA- EC_{3-7} -Konzentration und ansteigenden Konzentrationen des Liganden EK-1 zu einer signifikanten Potenzierung des GABA-induzierten Chloridstroms. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$; $n = 5$) beobachtet werden. Die maximale Potenzierung (E_{max}) betrug $566 \pm 39 \%$ ($n = 5$), die EC_{50} lag bei $18,4 \pm 3,7 \mu\text{M}$ und der Hill-Koeffizient bei $1,8 \pm 0,5$.

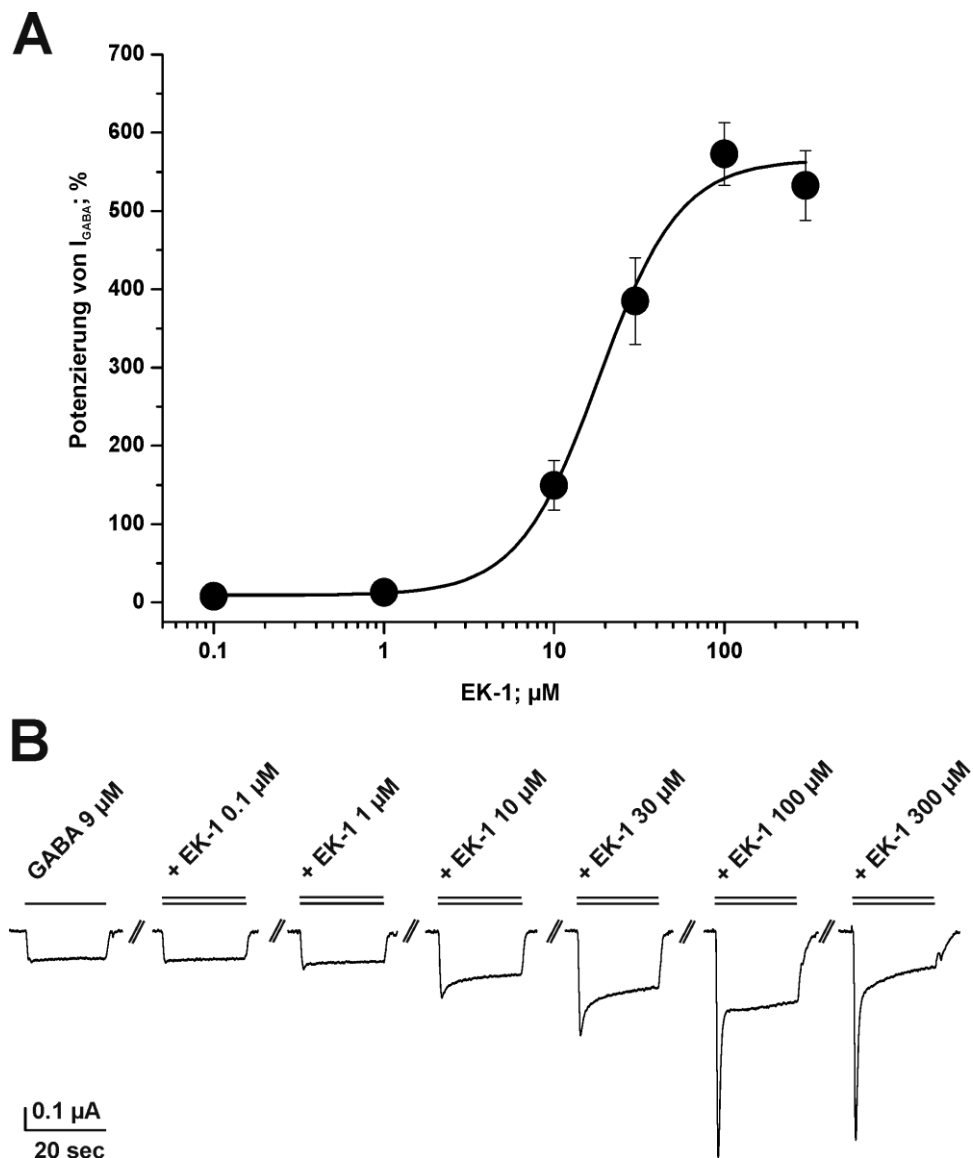


Abbildung 26: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch EK-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert $\pm$ SEM von zumindest 5 verschiedenen Experimenten an Oozyten von 2 verschiedenen Fröschen. (B) Abbildung typischer Ströme für die Modulation von I_{GABA} (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentrationen von EK-1 (doppelter Balken).

4.1.4. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptor durch EK-2

Wie in Abbildung 27 gezeigt, führte die Co-Applikation einer GABA-EC₃₋₇ und ansteigenden Konzentrationen des Liganden EK-2 zu einer signifikanten Potenzierung des GABA-induzierten Chloridstroms. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$; $n = 4$) beobachtet werden. Die maximale Potenzierung (E_{max}) betrug $420 \pm 0 \%$ ($n = 3$), die EC_{50} lag bei $77,7 \pm 12,3 \mu\text{M}$ und der Hill-Koeffizient bei $1,3 \pm 0,2$. Die E_{max} war im Vergleich zu EK-1 (strichlierte Kurve) ca. 25% niedriger und die apparente Affinität (EC_{50}) war etwa 4x niedriger.

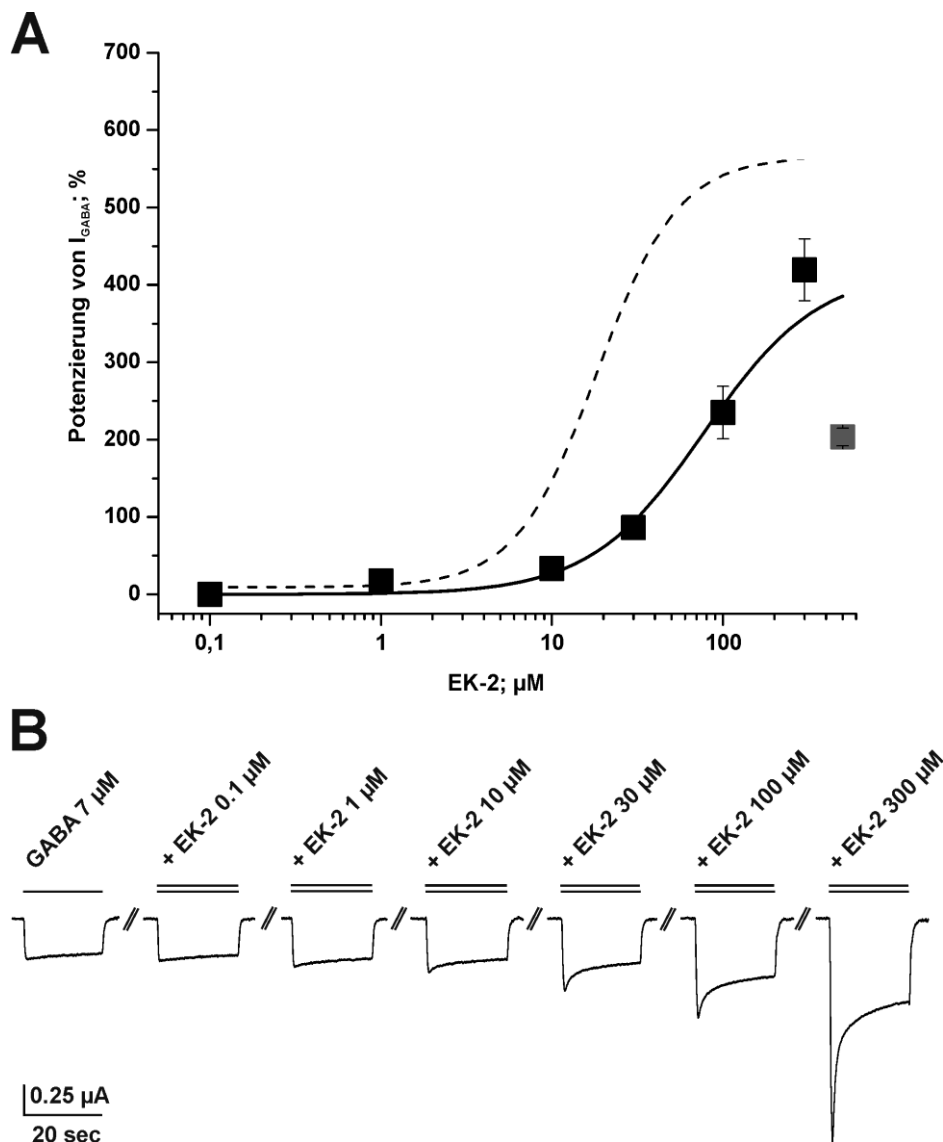


Abbildung 27: (A) Konzentrations-Wirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch EK-2. Die strichlierte Kurve zeigt die Modulation von I_{GABA} durch EK-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert $\pm$ SEM von zumindest 3 verschiedenen Experimenten an Oozyten von 2 verschiedenen Fröschen. Der graue Datenpunkt (Potenzierung von I_{GABA} bei 500 μM) wurde beim Kurven-Fit nicht berücksichtigt. **(B)** Abbildung typischer Ströme für die Modulation von I_{GABA} (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentrationen von EK-2 (doppelter Balken).

4.1.5. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptor durch EK-3

Wie in Abbildung 28 gezeigt, führte die Co-Applikation einer GABA-EC₃₋₇ und ansteigenden Konzentrationen des Liganden EK-3 zu einer signifikanten Potenzierung des GABA-induzierten Chloridstroms. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$; $n = 8$) beobachtet werden. Die maximale Potenzierung (E_{max}) betrug $345 \pm 48 \%$ ($n = 6$), die EC_{50} lag bei $78,0 \pm 20,7 \mu\text{M}$ und der Hill-Koeffizient bei $1,4 \pm 0,2$. Die E_{max} war im Vergleich zu EK-1 (strichlierte Kurve) ca. 40% niedriger und die apparente Affinität (EC_{50}) war auch hier etwa 4x niedriger.

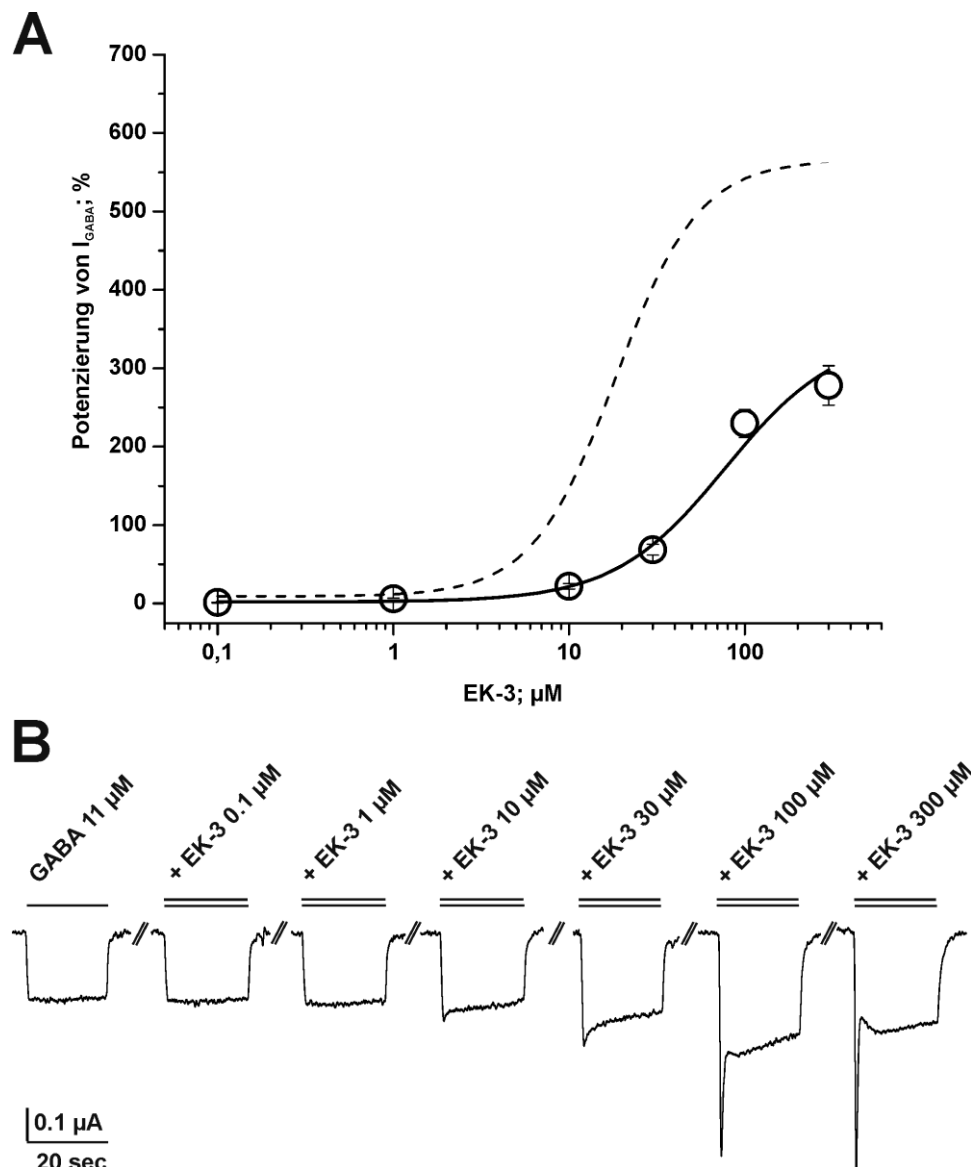


Abbildung 28: **(A)** Konzentrations-Wirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch EK-3. Die strichlierte Kurve zeigt die Modulation von I_{GABA} durch EK-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert $\pm$ SEM von zumindest 6 verschiedenen Experimenten an Oozyten von 2 verschiedenen Fröschen. **(B)** Abbildung typischer Ströme für die Modulation von I_{GABA} (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentrationen von EK-3 (doppelter Balken).

4.1.6. Potenzierung von I_{GABA} am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptor durch EK-4

Wie in Abbildung 29 gezeigt, führte die Co-Applikation einer GABA-EC₃₋₇ und ansteigenden Konzentrationen des Liganden EK-4 zu einer signifikanten Potenzierung des GABA-induzierten Chloridstroms. Erste signifikante Effekte konnten bei Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$; $n = 5$) beobachtet werden. Die maximale Potenzierung (E_{max}) betrug $375 \pm 60 \%$ ($n = 4$), die EC_{50} lag bei $74,9 \pm 21,9 \mu\text{M}$ und der Hill-Koeffizient bei $1,4 \pm 0,2$. Die maximale Potenzierung von I_{GABA} durch EK-4 war im Vergleich zu EK-1 (strichlierte Kurve) um ca. 35% schwächer ausgeprägt, während die apparente Affinität (EC_{50}) wiederum etwa 4x niedriger war.

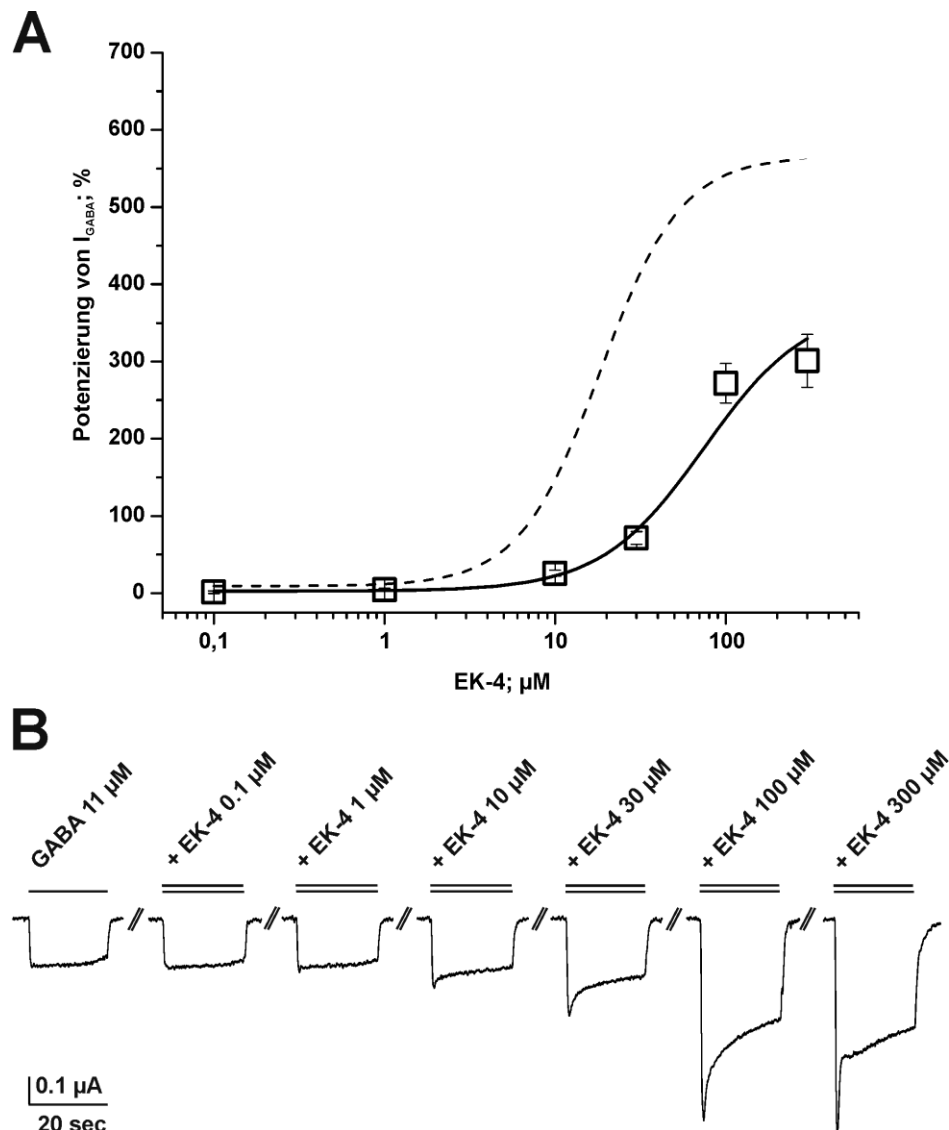


Abbildung 29: **(A)** Konzentrations-Wirkungskurve für die Potenzierung von I_{GABA} durch EK-4. Die strichlierte Kurve zeigt die Modulation von I_{GABA} durch EK-1. Jeder Datenpunkt entspricht einem Mittelwert $\pm$ SEM von zumindest 4 verschiedenen Experimenten an Oozyten von 2 verschiedenen Fröschen. **(B)** Abbildung typischer Ströme für die Modulation von I_{GABA} (einfacher Balken) durch ansteigende Konzentrationen von EK-4 (doppelter Balken).

4.1.7. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse anhand ausgewählter Parameter

	$E_{\max}$; %	EC_{50} ; μM	n_H	n
EK-1	566 ± 39	$18,4 \pm 3,7$	$1,8 \pm 0,5$	5
EK-2	420 ± 0	$77,7 \pm 12,3$	$1,3 \pm 0,2$	3
EK-3	345 ± 48	$78,0 \pm 20,7$	$1,4 \pm 0,2$	6
EK-4	375 ± 60	$74,9 \pm 21,9$	$1,4 \pm 0,2$	4

Tabelle 3: Zusammenfassung der Parameter $E_{\max}$, EC_{50} , n_H und n der Konzentrations-wirkungskurven der untersuchten Naturstoffderivate am GABA_A-Rezeptor-Subtyp $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$.

EC_{50} $E_{\max}$	EK-1	EK-2	EK-3	EK-4
EK-1				
EK-2	**			
EK-3	*	ns		
EK-4	*	*	ns	

Tabelle 4: Vergleich der $E_{\max}$ (links unten) und EC_{50} (rechts oben) von EK-1, EK-2, EK-3 und EK-4 am $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ GABA_A-Rezeptor.

ns ... nicht signifikant

* ... signifikant ($p < 0,05$)

** ... sehr signifikant ($p < 0,01$)

4.2. Untersuchung der Effekte ausgewählter Derivate von EK-0 auf das explorative Verhalten im Open-Field-Test (OF)

4.2.1. Dosisabhängige Effekte von EK-1 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF

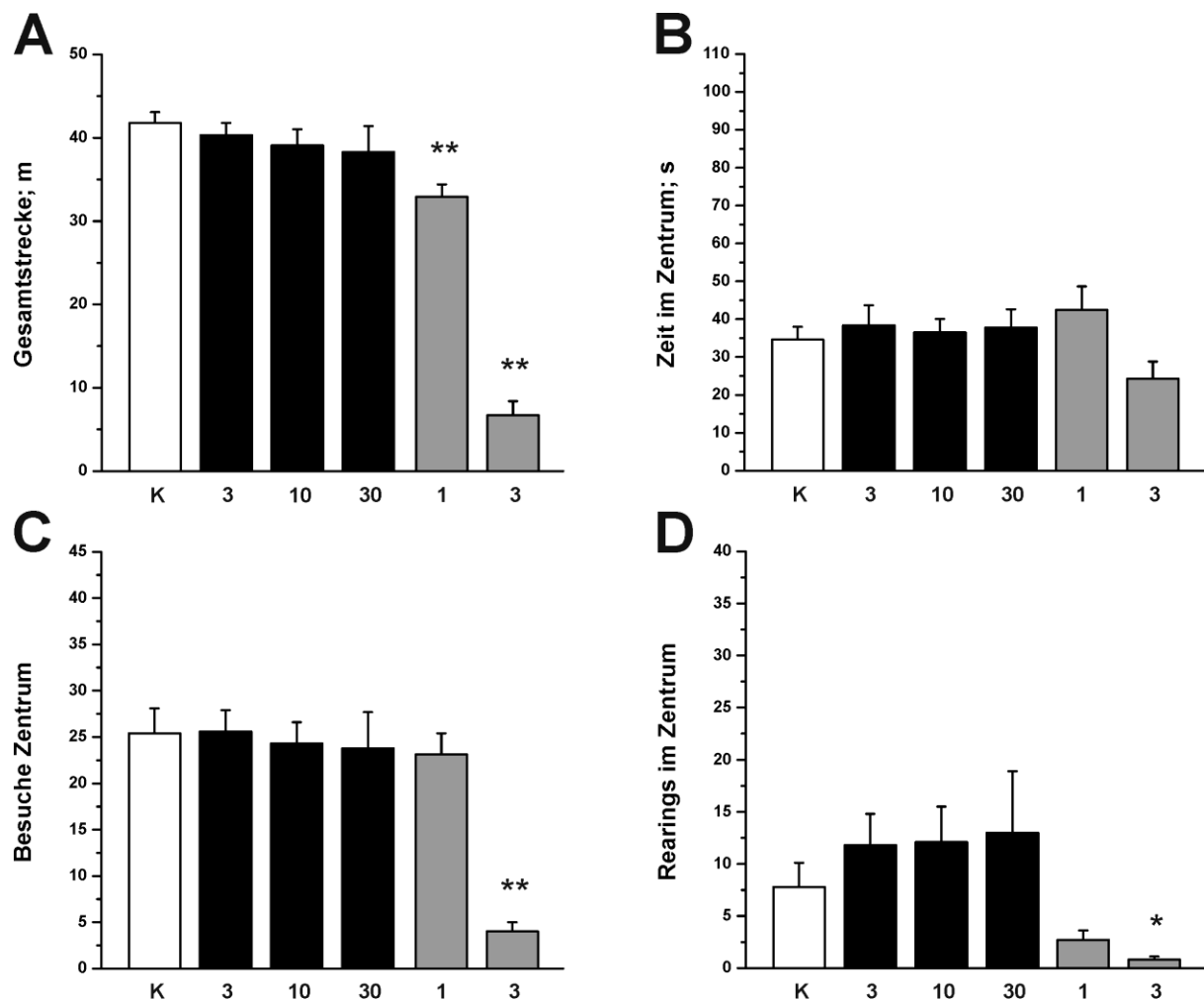


Abbildung 30: Darstellung der Effekte von den angegebenen Dosen von EK-1 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im OF, 30 Minuten nach i.p. Applikation auf die Gesamtstrecke in Meter (**A**), die Zeit im Zentrum in Sekunden (**B**), die Anzahl der Besuche (**C**) und Rearings (**D**) im Zentrum. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Gesamtstrecke; m	Zeit im Zentrum; s	Besuche im Zentrum	Rearings im Zentrum	Versuchstiere; n
Kontrolle	41,8 ± 1,3	34,6 ± 3,4	25,4 ± 2,7	7,8 ± 2,3	13
EK-1 3 mg/kg	40,3 ± 1,5	38,4 ± 5,3	25,6 ± 2,3	11,8 ± 3,0	11
EK-1 10 mg/kg	39,1 ± 1,9	36,5 ± 3,6	24,3 ± 2,3	12,1 ± 3,4	8
EK-1 30 mg/kg	38,3 ± 3,1	37,8 ± 4,5	23,8 ± 3,9	13,0 ± 5,9	4
DZP 1 mg/kg	32,9 ± 1,5	42,5 ± 5,7	23,2 ± 2,3	2,7 ± 0,9	12
DZP 3 mg/kg	6,7 ± 1,7	24,3 ± 4,5	4,0 ± 1,0	0,8 ± 0,3	9

Tabelle 5: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-1 und Diazepam im OF 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 30A gezeigt, kam es nach Applikation ansteigender Dosen von EK-1 zu keiner signifikanten Änderung der Gesamtstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Gesamtstrecke nach Applikation von Diazepam beobachtet (Kontrollgruppe: 41,8±1,3, n=13 vs. Diazepam 1 mg/kg: 32,9±1,5 m, n=12, p<0.01 vs. Diazepam 3 mg/kg: 6,7±1,7 m, n=9; p<0,01).

Nach Applikation von EK-1 und Diazepam (1 mg/kg) zeichnete sich ein Trend zu mehr verbrachter Zeit im Zentrum ab, der jedoch nicht statistische Signifikanz erreichte (Abb. 30B).

Ebenso kam es zu keiner signifikanten Änderung der Zahl der Besuche des Zentrums nach Applikation von EK-1. Signifikant weniger Besuche wurden nach Applikation von 3 mg/kg Diazepam gezählt (Kontrollgruppe: 25,4±2,7, n=13 vs. Diazepam 3mg/kg: 4,0±1,0, n=9; p<0,01; Abb 30C).

Wie in Abb. 30D illustriert, stieg nach Applikation der unterschiedlichen Dosen von EK-1 die Zahl der Rearings (Aufrichten des Tieres bzw. vertikale Aktivität) im Zentrum, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant (Kontrollgruppe: 7,8±2,3, n=13 vs. 3 mg/kg EK-1: 11,8±3,0, n=11 vs. EK-1 10 mg/kg 12,1±3,4, n=8 vs. EK-1 30 mg/kg 13,0±5,9, n=4; p>0,05). Im Gegensatz dazu kam es nach Applikation von 3 mg/kg Diazepam (0,8±0,3, n=9; p<0,05) zu einem signifikanten Rückgang der Rearings im Zentrum im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.2. Dosisabhängige Effekte von EK-3 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF

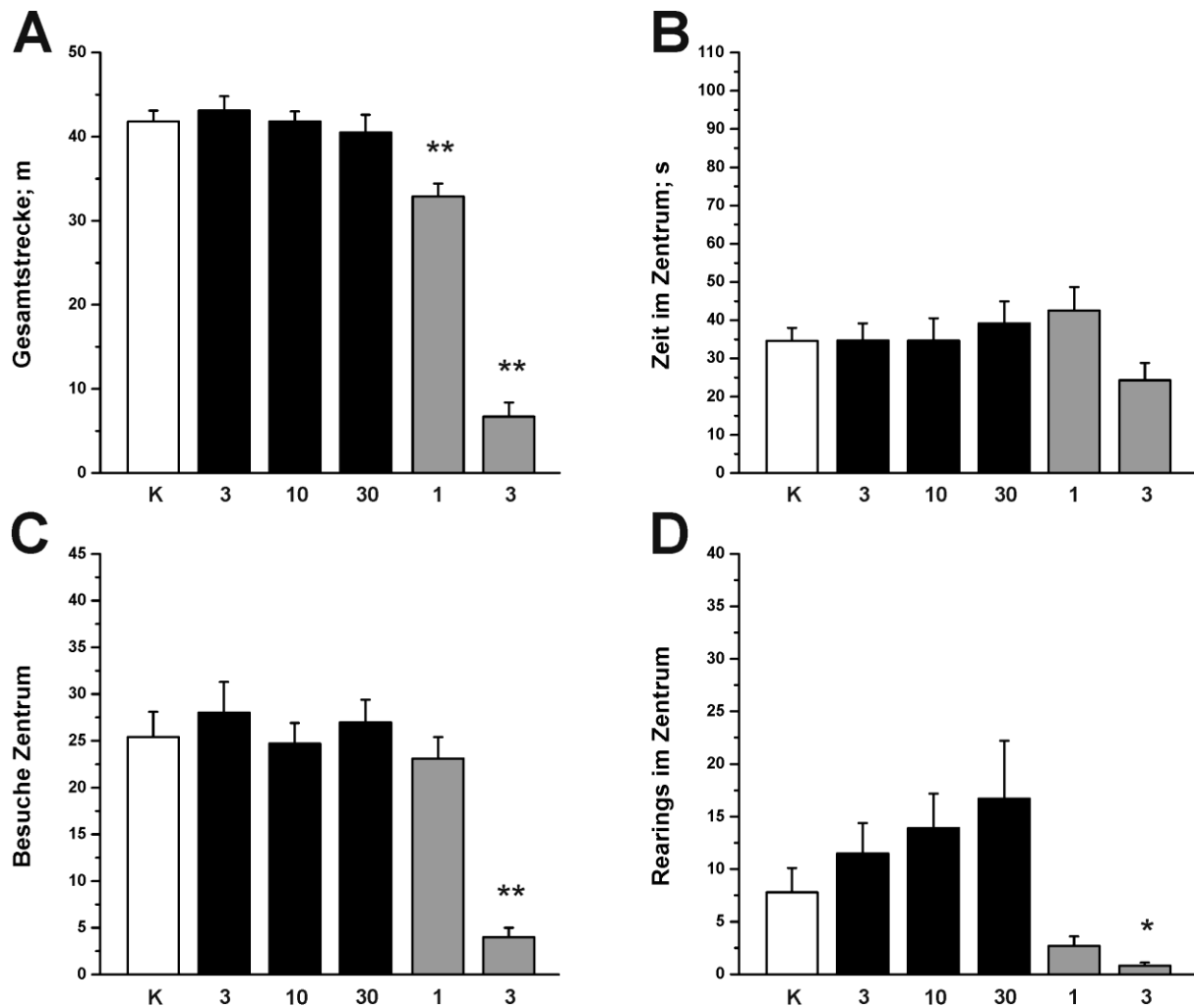


Abbildung 31: Darstellung der Effekte der angegebenen Dosen von EK-3 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im OF, 30 Minuten nach i.p. Applikation auf die Gesamtstrecke in Meter (**A**), die Zeit im Zentrum in Sekunden (**B**), die Anzahl der Besuche (**C**) und Rearings (**D**) im Zentrum. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Gesamtstrecke; m	Zeit im Zentrum; s	Besuche im Zentrum	Rearings im Zentrum	Versuchstiere; n
Kontrolle	41,8 ± 1,3	34,6 ± 3,4	25,4 ± 2,7	7,8 ± 2,3	13
EK-3 3 mg/kg	43,1 ± 1,7	34,7 ± 4,5	28,0 ± 3,3	11,5 ± 2,9	12
EK-3 10 mg/kg	41,8 ± 1,2	34,7 ± 5,8	24,7 ± 2,2	13,9 ± 3,3	15
EK-3 30 mg/kg	40,5 ± 2,1	39,2 ± 3,0	27,0 ± 2,4	16,7 ± 5,5	9
DZP 1 mg/kg	32,9 ± 1,5	42,5 ± 5,7	23,2 ± 2,3	2,7 ± 0,9	12
DZP 3 mg/kg	6,7 ± 1,7	24,3 ± 4,5	4,0 ± 1,0	0,8 ± 0,3	9

Tabelle 6: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-3 und Diazepam im OF 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 31A gezeigt, kam es nach Applikation von EK-3 zu keiner signifikanten Änderung der Gesamtstrecke, der Zeit im Zentrum (Abb. 31B) bzw. der Besuche im Zentrum (Abb. 31C) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Interessanterweise, stieg die Zahl der Rearings im Zentrum nach Applikation von EK-3 dosisabhängig im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: 7,8±2,3, n=13 vs. EK-3 3 mg/kg: 11,5±2,9, n=12 vs. EK-3 10mg/kg: 13,9±3,3, n=15 vs. EK-3 30 mg/kg: 16,7±5,5, n=9). Dieser Effekt erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p>0.05$).

4.2.3. Dosisabhängige Effekte von EK-5 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF

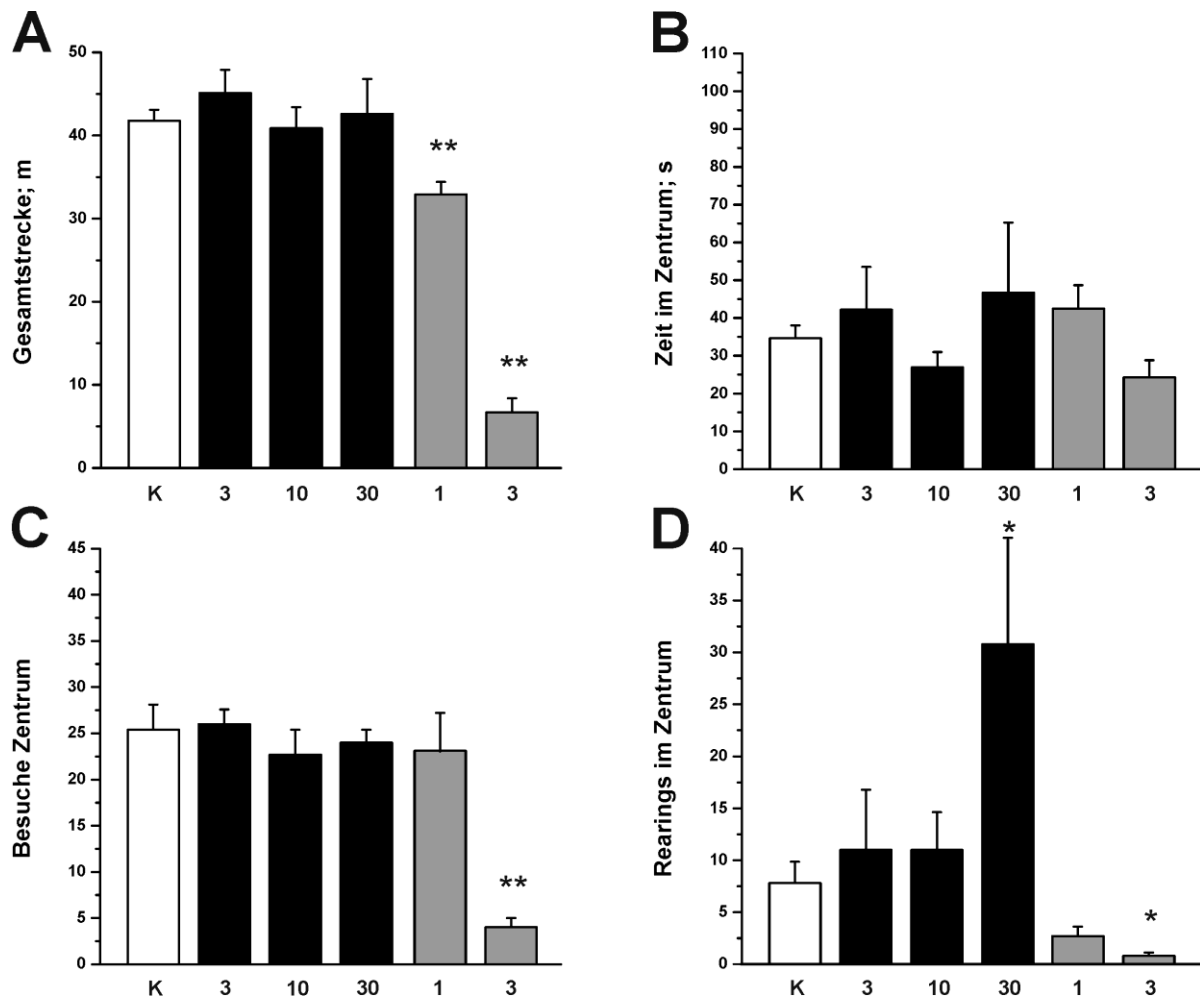


Abbildung 32: Darstellung der Effekte der angegebenen Dosen von EK-5 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im OF, 30 Minuten nach i.p. Applikation auf die Gesamtstrecke in Meter (**A**), die Zeit im Zentrum in Sekunden (**B**), die Anzahl der Besuche (**C**) und Rearings (**D**) im Zentrum. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Gesamtstrecke; m	Zeit im Zentrum; s	Besuche im Zentrum	Rearings im Zentrum	Versuchstiere; n
Kontrolle	41,8 ± 1,3	34,6 ± 3,4	25,4 ± 2,7	7,8 ± 2,3	13
EK-5 3 mg/kg	45,1 ± 2,8	42,2 ± 11,3	26,0 ± 1,6	11,0 ± 6,3	4
EK-5 10 mg/kg	40,9 ± 2,5	26,9 ± 4,1	22,7 ± 2,7	11,0 ± 4,0	7
EK-5 30 mg/kg	42,6 ± 4,2	46,7 ± 18,5	24,0 ± 6,2	30,8 ± 17,5	4
DZP 1 mg/kg	32,9 ± 1,5	42,5 ± 5,7	23,2 ± 2,3	2,7 ± 0,9	12
DZP 3 mg/kg	6,7 ± 1,7	24,3 ± 4,5	4,0 ± 1,0	0,8 ± 0,3	9

Tabelle 7: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-5 und Diazepam im OF 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 32A gezeigt, kam es auch nach Applikation von ansteigenden Dosen von Derivat EK-5 zu keiner signifikanten Änderung der Gesamtstrecke, der Zeit im Zentrum (Abb. 32B) und der Besuche im Zentrum (Abb. 32C).

Jedoch konnte eine Zunahme der Rearings im Zentrum beobachtet werden (Kontrolle: 7,8±2,3, n=13 vs. EK-5 3 mg/kg: 11,0±6,3, n=4 vs. EK-5 10 mg/kg: 11,0±4,0, n=7 vs EK-5 30 mg/kg: 30,8±17,5, n=4; p<0,05; siehe Abb. 32D)

4.2.4. Dosisabhängige Effekte von EK-6 auf das explorative Verhalten von C57BL/6N Mäusen im OF

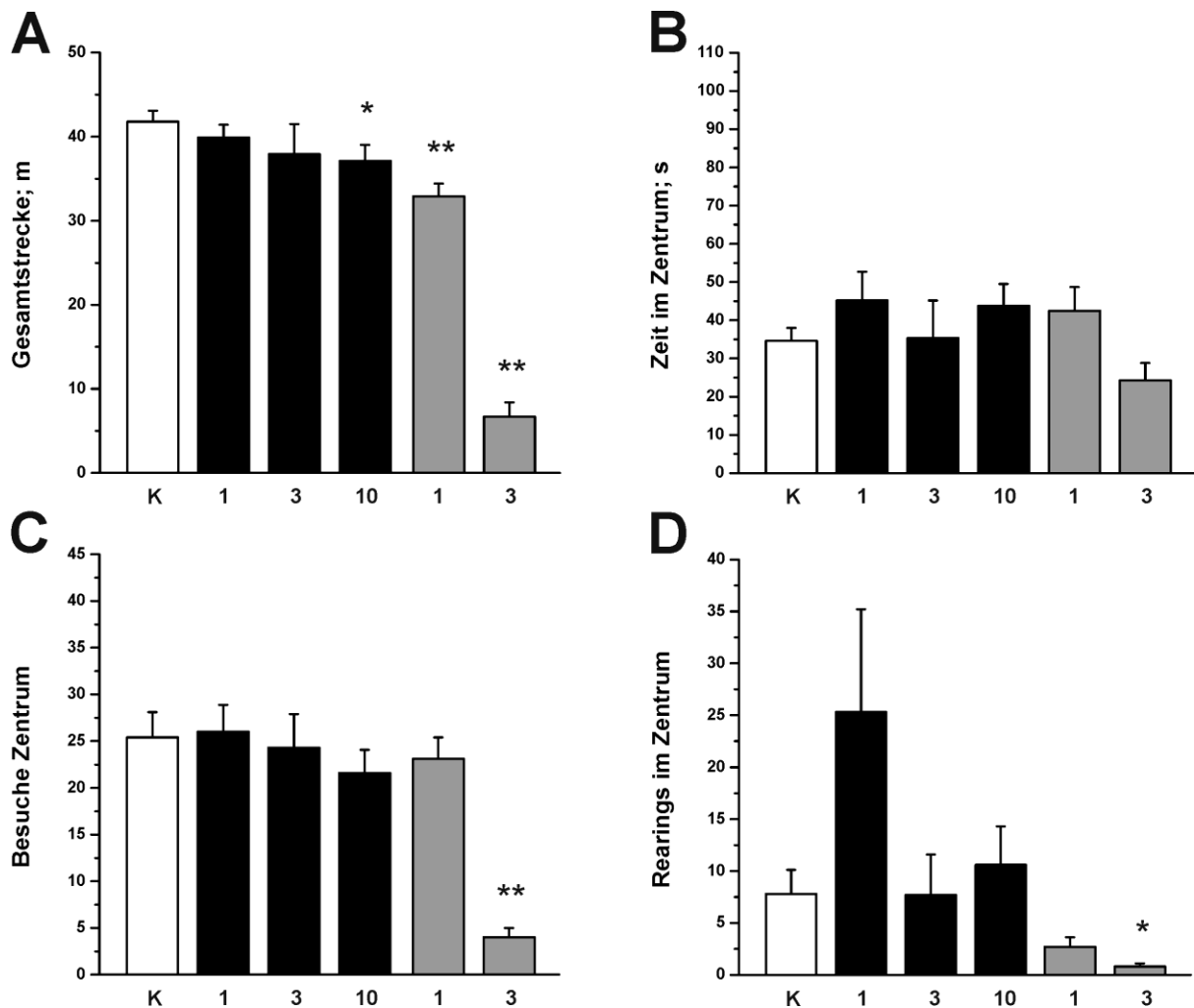


Abbildung 33: Darstellung der Effekte der angegebenen Dosen von EK-6 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im OF 30, Minuten nach i.p. Applikation auf die Gesamtstrecke in Meter (**A**), die Zeit im Zentrum in Sekunden (**B**), die Anzahl der Besuche (**C**) und Rearings (**D**) im Zentrum. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Gesamtstrecke; m	Zeit im Zentrum; s	Besuche im Zentrum	Rearings im Zentrum	Versuchstiere; n
Kontrolle	41,8 ± 1,3	34,6 ± 3,4	25,4 ± 2,7	7,8 ± 2,3	13
EK-6 1 mg/kg	39,9 ± 1,5	45,2 ± 7,5	26,0 ± 2,9	25,3 ± 9,9	10
EK-6 3 mg/kg	37,9 ± 3,6	35,3 ± 9,9	24,3 ± 3,6	7,7 ± 3,9	6
EK-6 10 mg/kg	37,1 ± 1,9	43,8 ± 5,7	21,6 ± 2,1	10,6 ± 3,7	7
DZP 1 mg/kg	32,9 ± 1,5	42,5 ± 5,7	23,2 ± 2,3	2,7 ± 0,9	12
DZP 3 mg/kg	6,7 ± 1,7	24,3 ± 4,5	4,0 ± 1,0	0,8 ± 0,3	9

Tabelle 8: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-6 und Diazepam im OF 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 33A gezeigt, unterschied sich die Gesamtstrecke der Mäuse nach Applikation von EK-6 in den Dosierungen 1 bzw. 3 mg/kg nicht signifikant von der Gesamtstrecke der Kontrollgruppe. Applikation einer höheren Dosis (i.e. 10 mg/kg) dagegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke (Kontrolle: 41,8±1,3, n=13 vs. EK-6 10 mg/kg: 37,1±1,9, n=7; p<0,05). Die Zeit im Zentrum (Abb. 33B.), Besuche des Zentrums (Abb. 33C) und ebenfalls die Zahl der Rearings im Zentrum (Abb. 33D) unterschied sich bei keiner Dosierung signifikant von der Kontrollgruppe.

4.3. Untersuchung der Effekte ausgewählter Derivate von EK-0 auf das angstbezogene Verhalten im Light/Dark-Choice-Test (LDT)

4.3.1. Dosisabhängige Effekte von EK-1 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT

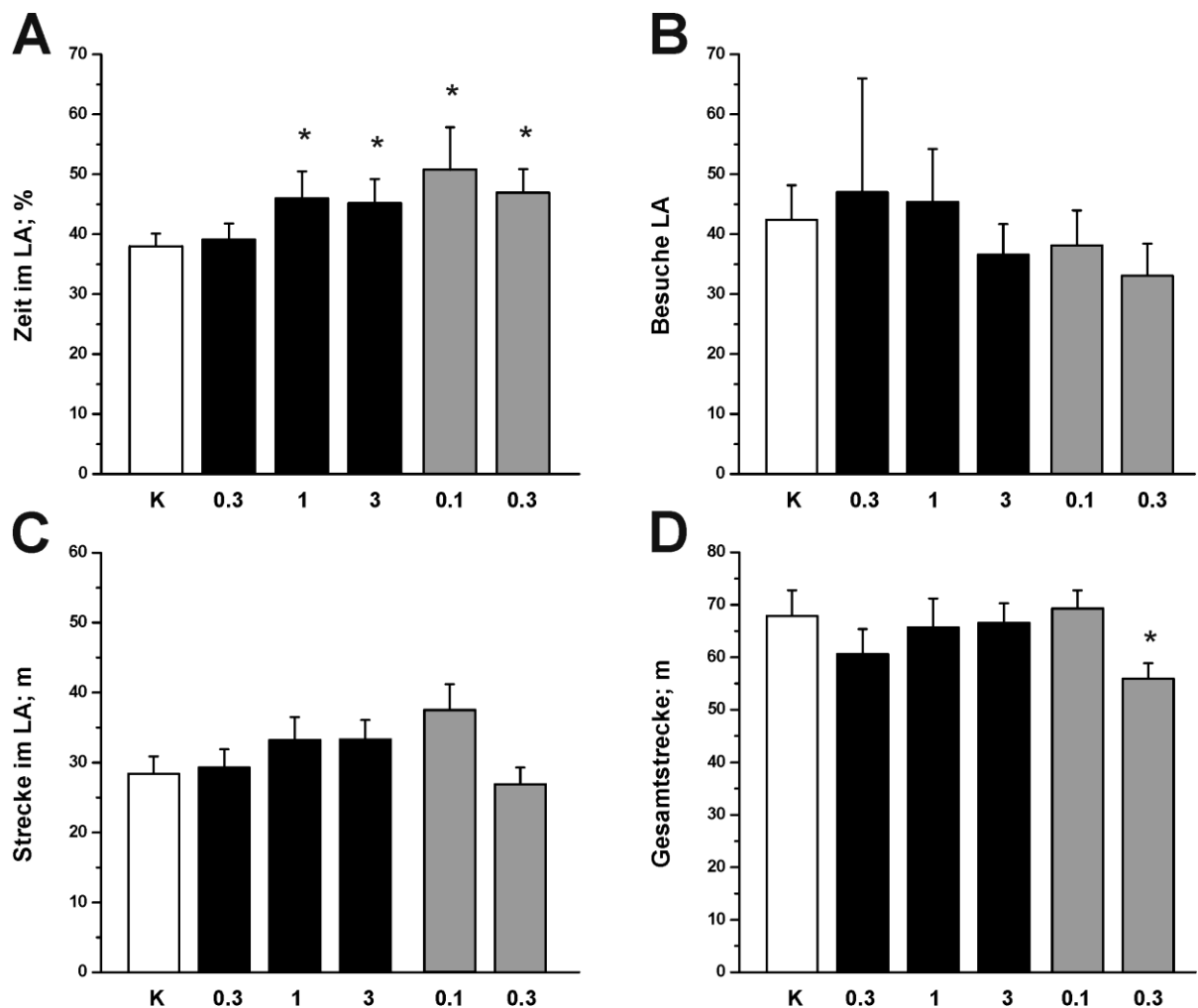


Abbildung 34: Darstellung der dosis-abhängigen Effekte von EK-1 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im LDT, 30 Minuten nach i.p. Applikation, auf die Zeit in der LA (Light Area) in Prozent **(A)**, die Anzahl der Besuche der LA **(B)**, die Strecke in der LA **(C)** und die Gesamtstrecke **(D)** in Meter. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Zeit im LA; %	Besuche im LA	Strecke im LA; m	Gesamt- strecke; m	Versuchs- tiere; n
Kontrolle	38,1 ± 2,4	42,6 ± 6,3	29,8 ± 2,0	66,9 ± 3,9	19
EK-1 0,3 mg/kg	39,1 ± 2,7	47,0 ± 19,0	29,3 ± 2,6	60,6 ± 4,8	8
EK-1 1 mg/kg	46,0 ± 4,5	45,4 ± 8,8	33,2 ± 3,3	65,7 ± 5,5	9
EK-1 3 mg/kg	45,2 ± 4,0	36,6 ± 5,1	33,3 ± 2,8	66,6 ± 3,7	13
DZP 0,1 mg/kg	51,1 ± 6,7	38,4 ± 5,8	37,6 ± 6,9	68,1 ± 4,6	10
DZP 0,3 mg/kg	47,3 ± 4,0	33,2 ± 4,7	27,0 ± 2,0	56,1 ± 2,9	12

Tabelle 9: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-1 und Diazepam im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 34A gezeigt, verbrachten Mäuse 30 min nach i.p. Applikation von EK-1 signifikant mehr Zeit in der LA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: 38,1±2,4, n=19 vs. EK-1 1 mg/kg: 46,0±4,5, n=9 vs. EK-1 3 mg/kg: 45,2±4,0, n=13; $p<0,05$). Ebenso verbrachten Tiere, die mit Diazepam 0,1 bzw 0,3 mg/kg behandelt wurden, signifikant mehr Zeit in der LA im Vergleich zu Kontrolltieren (Kontrolle: 38,1±2,4, n=19 vs. Diazepam 0,1 mg/kg: 51,1±6,7, n=10, $p<0,05$ vs. Diazepam 0,3 mg/kg: 47,3±4,0, n=12, $p<0,05$).

Keine signifikanten Änderungen der Laufstrecke in der LA (Abb. 34B) und der Besuche der LA (Abb. 34C) der mit EK-1 bzw. Diazepam behandelten Tiere konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Ebenso konnten keine signifikanten Änderungen der Gesamtstrecke nach Applikation von EK-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 34D). Im Gegensatz dazu, reduzierte die Applikation von 0,3 mg/kg Diazepam die Gesamtlaufstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: 66,9±3,9, n=19 vs. Diazepam 0,3 mg/kg: 68,1±4,6, n=10; $p<0,05$; Abb. 34D).

4.3.2. Dosisabhängige Effekte von EK-3 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT

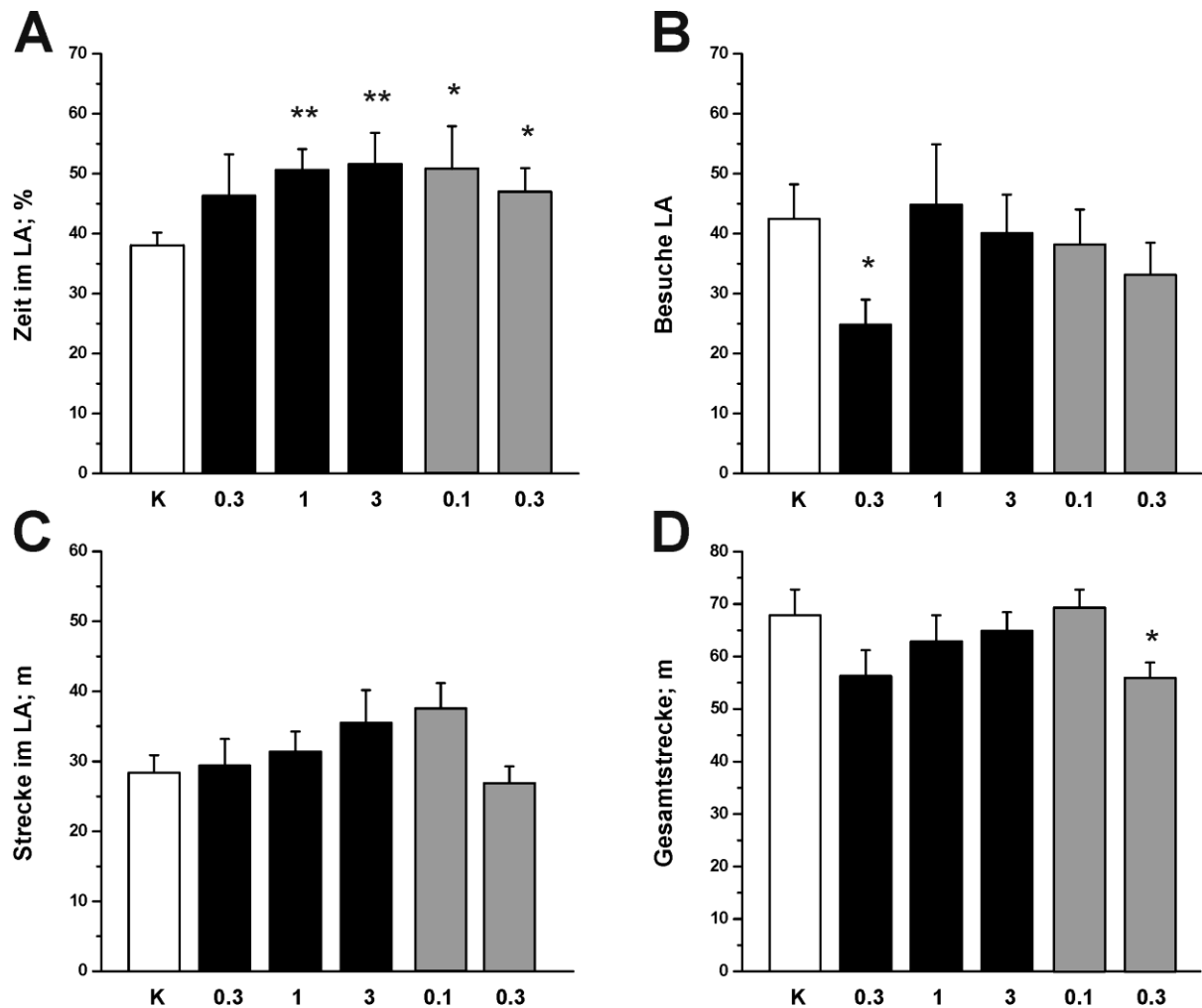


Abbildung 35: Darstellung der dosis-abhängigen Effekte von EK-3 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im LDT, 30 Minuten nach i.p. Applikation, auf die Zeit in der LA (Light Area) in Prozent (**A**), die Anzahl der Besuche der LA (**B**), die Strecke in der LA (**C**) und die Gesamtstrecke (**D**) in Meter. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Zeit im LA; %	Besuche im LA	Strecke im LA; m	Gesamt- strecke; m	Versuchs- tiere; n
Kontrolle	38,1 ± 2,4	42,6 ± 6,3	29,8 ± 2,0	66,9 ± 3,9	19
EK-3 0,3 mg/kg	46,3 ± 6,9	24,8 ± 4,2	29,4 ± 3,8	56,3 ± 4,9	11
EK-3 1 mg/kg	50,6 ± 3,5	44,8 ± 10,1	31,4 ± 2,9	62,9 ± 5,0	12
EK-3 3 mg/kg	51,6 ± 5,2	40,1 ± 6,4	35,5 ± 4,7	64,9 ± 3,6	13
DZP 0,1 mg/kg	51,1 ± 6,7	38,4 ± 5,8	37,6 ± 6,9	68,1 ± 4,6	10
DZP 0,3 mg/kg	47,3 ± 4,0	33,2 ± 4,7	27,0 ± 2,0	56,1 ± 2,9	12

Tabelle 10: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-3 und Diazepam im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 35 gezeigt, verbrachten Mäuse nach Applikation ansteigender Dosen von EK-3 mehr Zeit in der LA im Vergleich zur Kontrollgruppe: Bereits nach Applikation von 0,3 mg/kg EK-3 konnte ein Anstieg dieses Parameters beobachtet werden, erste statistische Signifikanz erreichte dieser Effekt bei einer Dosis von 1 mg/kg. Applikation von 3 mg/kg EK-3 führte zu keiner weiteren Erhöhung der Zeit in der LA.

Die Zahl der Besuche der LA war nach Applikation von 0,3 mg/kg EK-3 signifikant reduziert (Kontrolle: 42,6±6,3, n=19 vs. EK-3 0,3 mg/kg 24,8±4,2, n=11; $p<0,05$), während kein Effekt auf die Zahl der Besuche der LA bei höheren Dosierungen gemessen wurde (Abb. 35B). Laufstrecke in der LA (Abb. 35C) und Gesamtstrecke (Abb. 35D) von EK-3 behandelten Tieren unterschied sich in keiner Dosierung von der Kontrollgruppe.

4.3.3. Dosisabhängige Effekte von EK-5 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT

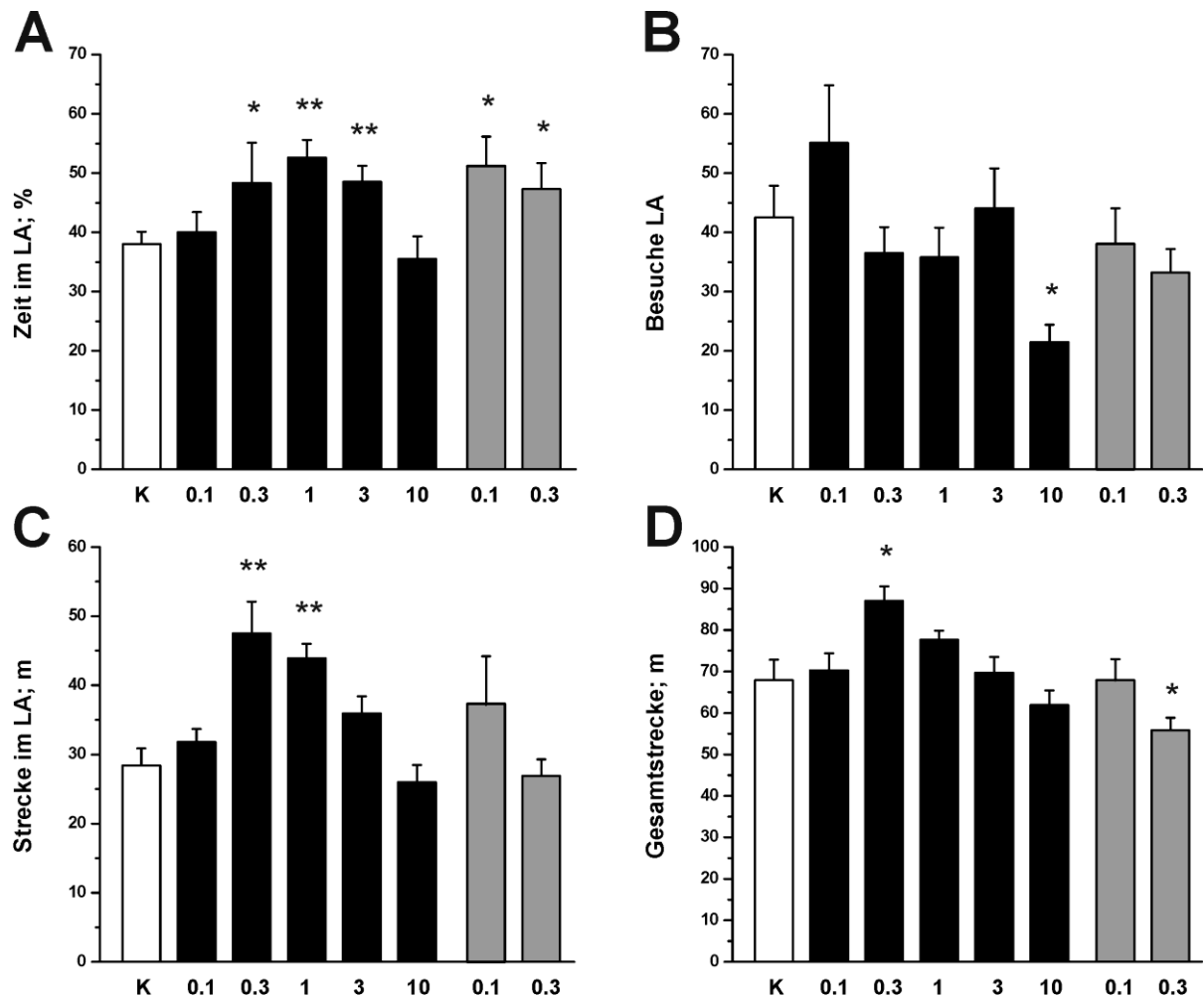


Abbildung 36: Darstellung der dosis-abhängigen Effekte von EK-5 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im LDT, 30 Minuten nach i.p. Applikation, auf die Zeit in der LA (Light Area) in Prozent (**A**), die Anzahl der Besuche der LA (**B**), die Strecke in der LA (**C**) und die Gesamtstrecke (**D**) in Meter. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Zeit im LA; %	Besuche im LA	Strecke im LA; m	Gesamt- strecke; m	Versuchs- tiere; n
Kontrolle	38,1 ± 2,4	42,6 ± 6,3	29,8 ± 2,0	66,9 ± 3,9	19
EK-5 0,1 mg/kg	40,0 ± 3,4	55,1 ± 9,7	31,8 ± 1,9	70,3 ± 4,1	10
EK-5 0,3 mg/kg	48,3 ± 6,8	36,5 ± 4,4	47,5 ± 4,6	87,0 ± 3,5	8
EK-5 1 mg/kg	52,6 ± 3,0	35,8 ± 5,0	43,9 ± 2,1	77,6 ± 2,2	16
EK-5 3 mg/kg	48,5 ± 2,7	44,1 ± 6,7	35,9 ± 2,5	69,7 ± 3,8	12
EK-5 10 mg/kg	35,5 ± 3,8	21,5 ± 2,9	26,0 ± 2,5	61,9 ± 3,5	8
DZP 0,1 mg/kg	51,1 ± 6,7	38,4 ± 5,8	37,6 ± 6,9	68,1 ± 4,6	10
DZP 0,3 mg/kg	47,3 ± 4,0	33,2 ± 4,7	27,0 ± 2,0	56,1 ± 2,9	12

Tabelle 11: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-5 und Diazepam im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Wie in Abb. 36A gezeigt, verbrachten Tiere, die mit ≥ 3 mg/kg Derivat EK-5 behandelt wurden, signifikant mehr Zeit in der LA als die Kontrollgruppe (Kontrolle: $38,1 \pm 2,4$, $n=19$ vs. EK-5 0,3 mg/kg: $48,3 \pm 6,8$, $n=8$, $p < 0,05$). Jedoch konnte keine Dosisabhängigkeit beobachtet werden (EK-5 1 mg/kg: $52,6 \pm 3,0$, $n=16$ vs EK-5 3 mg/kg: $48,5 \pm 2,5$, $n=12$). Darüberhinaus unterschied sich die Zeit in der LA nach Gabe höherer Dosen von EK-5 (i.e. 10 mg/kg) nicht mehr von der der Kontrolltiere.

Kein Effekt auf die Zahl der Besuche der LA konnte nach Applikation EK-5 (0,1-3 mg/kg) beobachtet werden; Applikation von 10 mg/kg EK-5 resultierte, ähnlich wie auch hinsichtlich der Zeit in der LA bereits beobachtet, in einer signifikanten Reduktion der Zahl der Besuche der LA (Kontrolle: $42,6 \pm 6,3$, $n=19$ vs. EK-5 10 mg/kg: $21,5 \pm 2,9$, $n=8$; $p < 0,05$; Abb. 36B).

Signifikant längere Strecken in der LA im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden nach Applikation von 0,3 bzw. 1 mg/kg EK-4 beobachtet (Kontrolle: $29,8 \pm 2,0$, $n=19$ vs. EK-5 0,3 mg/kg: $47,5 \pm 4,6$, $n=8$, $p < 0,01$ vs. EK-5 1 mg/kg: $43,9 \pm 2,1$, $n=16$; $p < 0,01$; Abb. 36C). Wiederum aber kam es nach Applikation von 10 mg/kg EK-5 zu einer Reduktion der Strecke in der LA (Kontrolle: $29,8 \pm 2,0$, $n=19$ vs. EK-5 10 mg/kg: $26,0 \pm 2,5$, $n=8$).

Die Kontrollgruppe legte insgesamt eine Strecke von $66,9 \pm 3,9$ Meter ($n=19$) zurück. Applikation von EK-5 (0,3 mg/kg) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle: $66,9 \pm 3,9$, $n=19$ vs. EK-5 0,3 mg/kg: $87,0 \pm 3,5$, $n=8$; $p < 0,05$). Die Gesamtstrecke von Tieren, die mit EK-5 in Dosierungen $< 0,3$ mg/kg bzw. $> 0,3$ mg/kg behandelt wurden, unterschied sich hingegen nicht signifikant von der der Kontrollgruppe (Abb. 36D).

4.3.4. Dosisabhängige Effekte von EK-6 auf das angstbezogene Verhalten von C57BL/6N Mäusen im LDT

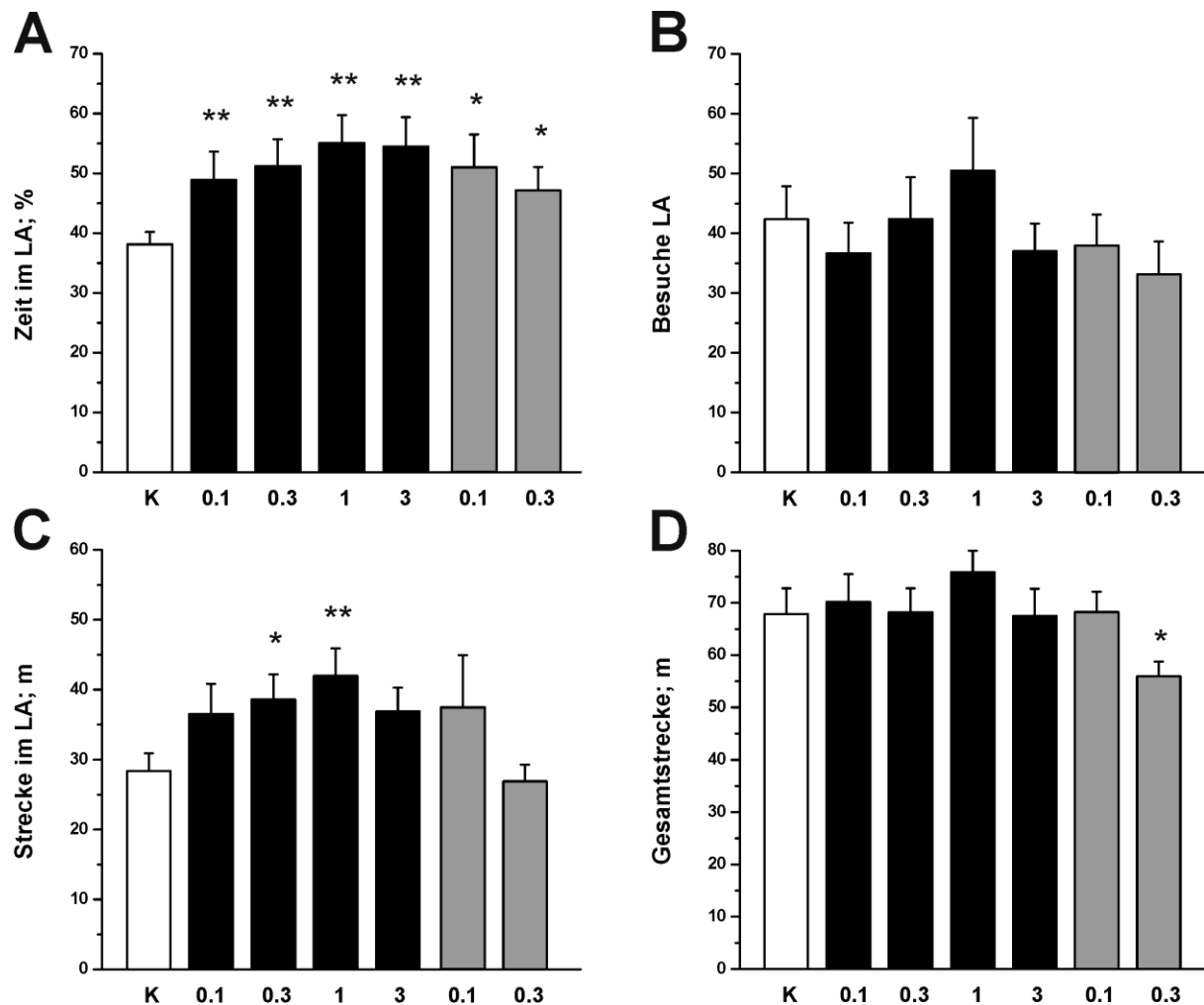


Abbildung 37: Darstellung der dosis-abhängigen Effekte von EK-6 (schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weiße Balken) und Diazepam (graue Balken, Positivkontrolle) im LDT, 30 Minuten nach i.p. Applikation, auf die Zeit in der LA (Light Area) in Prozent (**A**), die Anzahl der Besuche der LA (**B**), die Strecke in der LA (**C**) und die Gesamtstrecke (**D**) in Meter. Bei den angegebenen Werten handelt es sich immer um Mittelwerte $\pm$ SEM. (*) bedeutet $p < 0,05$ bzw. (**) $p < 0,01$.

	Zeit im LA; %	Besuche im LA	Strecke im LA; m	Gesamt- strecke; m	Versuchs- tiere; n
Kontrolle	38,1 ± 2,4	42,6 ± 6,3	29,8 ± 2,0	66,9 ± 3,9	19
EK-6 0,1 mg/kg	48,9 ± 4,7	36,7 ± 5,1	36,5 ± 4,3	70,2 ± 5,3	10
EK-6 0,3 mg/kg	51,2 ± 4,5	42,4 ± 7,0	38,6 ± 3,6	68,2 ± 4,6	9
EK-6 1 mg/kg	55,1 ± 4,6	50,5 ± 8,8	42,0 ± 3,9	75,9 ± 4,4	10
EK-6 3 mg/kg	54,5 ± 4,9	37,0 ± 4,6	36,9 ± 3,4	67,5 ± 3,3	9
DZP 0,1 mg/kg	51,1 ± 6,7	38,4 ± 5,8	37,6 ± 6,9	68,1 ± 4,6	10
DZP 0,3 mg/kg	47,3 ± 4,0	33,2 ± 4,7	27,0 ± 2,0	56,1 ± 2,9	12

Tabelle 12: Zusammenfassung der Effekte (als Mittelwert ± SEM) der angegebenen Dosen von EK-6 und Diazepam im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation.

Applikation von EK-6 erhöhte dosis-abhängig die Zeit, die die Tiere in der LA verbrachten, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 37A). Erste signifikante Effekte konnten bereits bei einer Dosis von 0,1 mg/kg gemessen werden (Kontrolle: 38,1±2,4, n=19 vs. EK-6 0,1 mg/kg: 48,9±4,7, n=10; p<0,01). Applikation von Dosen ≥1 mg/kg EK-6 führte zu keiner weiteren Steigerung des Effekts (Abb. 37A).

Darüber hinaus legten die Tiere in der LA auch signifikant längere Strecken im Vergleich zur Kontrollgruppe zurück (Kontrolle: 29,8±2,0 n=19 vs. EK-6 0,3 mg/kg: 36,5±4,3, n=9; p<0,05 vs. EK-6 1 mg/kg: 42,0±3,9, n=10; p<0,01; siehe Abb. 37C).

Im Gegensatz dazu unterschied sich die Zahl der Besuche der LA (Abb. 37B) und die Gesamtstrecke (Abb. 37D) der mit EK-6 behandelten Tiere nicht von der der Kontrollgruppe.

5. Diskussion

GABA_A-Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren im Gehirn von Säugtieren und 20-30% der Neuronen sind GABAerg. Sie sind beteiligt an Angst, Wachheit, Bewusstsein, Ess- und Trinkverhalten, zirkadianem Rhythmus, Lernen und Merkfähigkeit (D'Hulst et al., 2009; Miller and Aricescu, 2014; Olsen and Sieghart, 2009; Rudolph and Knoflach, 2011). Defizite in der Expression oder Mutationen von GABA_A-Rezeptoren können zu verschiedensten neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen führen. Dazu gehören unter anderem Angststörungen, Depressionen, Epilepsie, Schizophrenie, Schlaganfall, Autismus, Chorea Huntington, Fragiles-X-Syndrom und das Prader-Willi-Syndrom (D'Hulst et al., 2009; Hines et al., 2012). In Europa sind Angststörungen mit einer 12-Monats-Prävalenz von 14% die häufigste psychiatrische Erkrankung. Sie sind chronische Erkrankungen mit starker Beeinträchtigung im Alltag und verursachen enorme Kosten an Patienten und Gesellschaft (Griebel and Holmes, 2013). Benzodiazepine wie Diazepam (Valium) sind nichtselektive Modulatoren des GABA_A-Rezeptors und werden aufgrund der hohen anxiolytischen Wirksamkeit seit über 50 Jahren in der Behandlung von Angststörungen eingesetzt. Allerdings können diese zu unerwünschten Wirkungen wie Sedierung, Gedächtnisbeeinträchtigungen und Koordinationsstörungen führen, die besonders bei älteren Patienten das Risiko von Hüftfrakturen erhöhen. Nachteile bei Langzeitanwendung sind Toleranzentwicklung und das hohe Abhängigkeits- und Missbrauchspotential (Rudolph and Knoflach, 2011; Skolnick, 2012). Daher gelten bei generalisierten Angststörungen, der häufigsten Form von Angststörungen, selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRIs) als Mittel der Wahl bzw. First-Line-Therapie. Diese bewirken aber erst frühestens nach 4 Wochen einen Rückgang der Symptome. Darüber hinaus können SSRIs am Beginn der Therapie zu einer Verschlechterung der Symptome führen. Deshalb werden zur akuten Behandlung häufig Benzodiazepine verschrieben (Skolnick, 2012). Seitdem die spezifischen Funktionen und Verteilung der jeweiligen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bekannt sind, wird an Untereinheiten-selektiven Wirkstoffen geforscht, die die schnelle und starke anxiolytische Wirkung der Benzodiazepine besitzen, aber frei von deren Nebenwirkungen sein sollten (Rudolph and Knoflach, 2011; Rudolph and Möhler, 2006; Skolnick, 2012). Darüber hinaus könnten Untereinheiten-selektive Wirkstoffe wertvoll für neue Indikationen wie chronische Schmerzen, Depression, Schizophrenie, Gedächtnissteigerung und Schlaganfall sein (Rudolph and Knoflach, 2011; Rudolph and Möhler, 2006).

Am *Department für Pharmakologie und Toxikologie* der Universität Wien wird bereits seit mehreren Jahren die Wirkung von Naturstoffen an GABA_A-Rezeptoren erforscht. Mit EK-0 hat man *in vitro* einen $\beta_{2/3}$ -selektiven Modulator am GABA_A-Rezeptor identifiziert, der im Tier-

modell Anxiolyse ohne Sedierung hervorruft. Weiters konnte demonstriert werden, dass durch Derivatisierung von EK-0 *in vitro* die Wirksamkeit und Wirkstärke gesteigert, und *in vivo* der anxiolytische Effekt verstärkt werden kann.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten nun einige Derivate von EK-0 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

Zuerst sollten *in vitro* mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik die Wirksamkeit ($E_{\max}$) und Wirkstärke (EC_{50}) der ausgewählten Derivate EK-1, EK-2, EK-3 und EK-4 an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptoren charakterisiert werden.

Anschließend sollten *in vivo* die dosis-abhängigen Effekte von EK-1, EK-3 und zwei weiteren Derivaten EK-5 und EK-6 mit Hilfe des Open-Field- und Light/Dark-Choice-Tests untersucht werden.

In vitro potenzierten alle getesteten Derivate (**EK-1, EK-2, EK-3** und **EK-4**) den GABA-induzierten Chlorideinstrom an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptoren. Jedoch war EK-1 gemessen an der EC_{50} das mit Abstand potenteste Derivat. Bei Modulation durch EK-2 ($p<0,01$), EK-3 ($p<0,05$) und EK-4 ($p<0,05$) wurde der halbmaximale Effekt erst bei etwa 4x höheren Konzentrationen erreicht. Auch die $E_{\max}$ war bei EK-1 am stärksten ausgeprägt. Die maximale Potenzierung durch die anderen Derivate war mit 25% (EK-2; $p<0,05$), 40% (EK-3; $p<0,01$) und 35% (EK-4; $p<0,05$) signifikant niedriger. EK-2, EK-3 und EK-4 unterschieden sich bei EC_{50} und $E_{\max}$ meist nicht wesentlich voneinander, nur zwischen EK-2 und EK-4 wurde ein signifikanter Unterschied am EC_{50} -Wert gemessen ($p<0,05$).

In vivo wurde das Verhalten von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation der Derivate **EK-1, EK-3, EK-5** und **EK-6** untersucht.

Im **Open-Field-Test (OF)** wurde in erster Linie der Einfluss auf die lokomotorische Aktivität, aber auch auf das angstbezogene Verhalten analysiert. Mäuse haben naturgemäß Angst vor offenen Flächen und halten sich dementsprechend bevorzugt am Rand oder in der Ecke auf. Werden im OF im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Werte bei der Zeit im Zentrum, der Anzahl der Besuche und/oder der Rearings (Aufrichten des Tieres bzw. vertikale Aktivität) im Zentrum gemessen, kann man auf anxiolytische Effekte schließen. Eine Reduktion der Gesamtstrecke wird hingegen eindeutig als sedierende Wirkung interpretiert (Prut and Belzung, 2003).

Letztere konnte bei den mit EK-1, EK-3 und EK-5 behandelten Mäusen nicht beobachtet werden. Bei EK-6 führte nur die höchste Dosierung zur einer signifikanten Reduktion der Gesamtstrecke ($p<0,05$). Hingegen verringerte sich die Laufstrecke in der Diazepamgruppe signifikant ($p<0,01$), wobei der besonders niedrige Wert bei höherer Dosierung die Dosis-abhängigkeit der Sedierung verdeutlichen konnte.

Weiters zeigten alle Derivate eine dosisabhängige Erhöhung der Anzahl der Rearings im Zentrum gegenüber der Kontrollgruppe. Aber nur bei EK-5 in der höchsten Dosierung war der Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Dies deutet anxiolytische Effekte an. Diese wurden in der Diazepamgruppe, mit deutlich weniger Rearings im Zentrum als in der Kontrollgruppe (bei höherer Dosierung signifikant; $p < 0,05$), wahrscheinlich von der sedierenden Wirkung maskiert.

Im **Light/Dark-Choice-Test (LDT)**, der sich die Angst der Mäuse vor hellem Licht zunutze macht (Campos et al., 2013), führten alle Derivate zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zeit in der LA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikant war dieser Effekt bei EK-1 ($p < 0,05$) und EK-3 ($p < 0,01$) in den beiden höheren Dosierungen und bei EK-6 in jeder Dosierung ($p < 0,01$). Bei EK-5 zeigte sich bei 0,1 mg/kg zunächst kein Effekt, bei 0,3 mg/kg wurde eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) beobachtet, bei 1 und 3 mg/kg ebenfalls ($p < 0,01$) und bei 10 mg/kg war der Effekt wieder verschwunden. In der Diazepamgruppe war die Zeit in der LA ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,05$). Analog zu diesem Parameter wurde, in jeweils ähnlichem Ausmaß, auch die Strecke in der LA beeinflusst. Auch diese Effekte deuten stark auf eine anxiolytische Wirkung hin. Die Gesamtstrecke wurde weder durch die getesteten Derivate, noch durch 0,1 mg/kg Diazepam verändert. Nur bei Gabe von 0,3 mg/kg Diazepam konnte eine signifikante Sedierung ($p < 0,05$) beobachtet werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass auch diese ausgewählten Derivate potente und wirksame Liganden am GABA_A-Rezeptor sind, wobei sich mit EK-1 eine Substanz deutlich von den anderen abheben konnte. Im Tiermodell konnten alle Derivate wie erwartet eine gegenüber Diazepam vergleichbare Anxiolyse, ohne gleichzeitig auftretende Sedierung, hervorrufen.

Ob diese Derivate nun, nach erfolgreichen Untersuchungen zur Pharmakokinetik, das Potential bis hin zu einer Zulassung als Anxiolytikum haben könnten, ist fraglich. Seit fast 4 Jahrzehnten wird präklinisch nach Arzneistoffkandidaten am GABA_A-Rezeptor gesucht, die anxiolytisch, aber nicht sedierend wirken. Meist konnte das Fehlen der sedierenden Effekte im Tiermodell jedoch nicht in klinischen Studien bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten Unterschiede in der Zusammensetzung und Verteilung der GABA_A-Rezeptoren zwischen Tier und Mensch sein. Nur Alpidem (Ananxyl), ein Imidazopyridin, hat 1991 in Frankreich die Zulassung erreicht, wurde aber nach kurzer Zeit aufgrund von Leberschädigungen wieder vom Markt genommen (Skolnick, 2012).

6. Zusammenfassung

Hintergrund: γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn von Säugetieren. GABA_A-Rezeptoren sind pentamere ligandengesteuerte Ionenkanäle, deren Zusammensetzung, Funktion und Verteilung aufgrund von 19 unterschiedlichen Untereinheiten stark variieren kann. Fehlfunktionen des GABAergen Systems können über Dysbalancen der neuronalen Erregbarkeit unter anderem zu Angststörungen, Depressionen, Schlafstörungen und Epilepsie führen. Zahlreiche Modulatoren wie Benzodiazepine, Neurosteroiden, Anästhetika und Antikonvulsiva können über allosterische Bindungsstellen den GABA-induzierten Chlorideinstrom verstärken und dadurch anxiolytische, sedierende und antikonvulsive Wirkungen hervorrufen.

Problemstellung und Zielsetzung: Angststörungen haben unter den psychiatrischen Erkrankungen die höchste Prävalenz und werden aufgrund der hohen anxiolytischen Wirksamkeit häufig mit Benzodiazepinen behandelt. Diese wirken aber unselektiv an mehreren Subtypen von GABA_A-Rezeptoren und können daher zu unerwünschten Effekten wie Sedierung, Toleranz und Abhängigkeit führen. Deshalb wird an Untereinheiten-selektiven Wirkstoffen geforscht, welche eine vergleichbare Anxiolyse, möglichst ohne Nebenwirkungen hervorrufen sollen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten nun ausgewählte Derivate des $\beta_{2/3}$ -selektiven Naturstoffes EK-0 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

Methoden: *in vivo*: Expression von $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ -Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten, Messung der Potenzierung von I_{GABA} durch EK-1, EK-2, EK-3, EK-4 mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik und Bestimmung der Wirksamkeit (E_{max}) und Wirkstärke (EC_{50}). *In vivo*: Untersuchung der dosisabhängigen Effekte von EK-1, EK-3, EK-5, EK-6 im Vergleich zu Diazepam auf das Verhalten von Mäusen im Open-Field- und Light/Dark-Choice-Test.

Ergebnisse und Diskussion: *in vitro* war EK-1 gemessen an der EC_{50} das mit Abstand potenteste Derivat. Bei Modulation durch EK-2, EK-3 und EK-4 wurde der halbmaximale Effekt erst bei etwa 4x höheren Konzentrationen erreicht. Auch die E_{max} war bei EK-1 am stärksten ausgeprägt. Die maximale Potenzierung durch die anderen Derivate war mit 25% (EK-2), 40% (EK-3) und 35% (EK-4) signifikant niedriger. Im OF konnte nur bei der höchsten EK-6-Dosierung und bei Diazepam eine signifikante Sedierung beobachtet werden. Alle Derivate zeigten eine dosisabhängige Erhöhung der Anzahl der Rearings im Zentrum, was auf anxiolytische Effekte hindeuten könnte. Im LDT führten alle Derivate, ähnlich wie Diazepam zu einer dosisabhängigen, meist signifikanten Erhöhung der Zeit in der LA und zu einer vergleichbaren Erhöhung der Strecke in der LA. Somit konnte in diesem Test eine dem Diazepam entsprechende Anxiolyse erreicht werden, aber ohne Sedierung, da die Gesamtstrecke nur durch die höhere Diazepam-Dosierung verringert wurde. Diese Arbeit liefert einen weiteren Beitrag zur präklinischen Erforschung potentieller Anxiolytika.

7. Abstract

Background: γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian brain. GABA_A-receptors are pentameric ligand-gated ion channels differing in subunit assembly, function and distribution owing to 19 different subunits. Imbalances in neuronal excitability due to GABAergic dysfunctions can, e.g., lead to anxiety disorders, depressions, sleep disturbance and epilepsy. Numerous modulators like benzodiazepines, neurosteroids, anesthetics and anticonvulsants act on allosteric binding sites to enhance the GABA induced chloride influx generating anxiolytic, sedative and anticonvulsive actions.

Aims: Anxiety disorders, the most prevalent among psychiatric disorders, are frequently treated by benzodiazepines based on their high anxiolytic efficacy. However, acting non-selectively on multiple GABA_A-receptor subtypes, benzodiazepines can lead to unwanted effects like sedation, tolerance and dependence. Thus, there is a medical need for subunit-selective agents, which should elicit similar anxiolysis, preferably with no side-effects. Within my diploma thesis, selected derivatives of the natural $\beta_{2/3}$ -selective GABA_A receptor modulator EK-0 should be characterized *in vitro* and *in vivo*.

Methods: *in vivo*: expression of $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -receptors in *xenopus laevis* oocytes, measurement of the potentiation of I_{GABA} through EK-1, EK-2, EK-3 and EK-4 by use of the 2-micro-electrode voltage clamp technique and determination of efficacy (E_{max}) and potency (EC_{50}). *In vivo*: analysis of dose-dependent effects of EK-1, EK-3, EK-5 and EK-6 compared to Diazepam on the behaviour of mice in the open-field- and light/dark-choice-test.

Results and discussion: *in vitro*, as measured by EC_{50} , EK-1 was by far the most potent derivative. In contrast, EK-2, EK-3 and EK-4 were less potent, reaching the half maximal effect at 4-fold higher concentrations. Likewise, most pronounced modulation of $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ receptors was observed for EK-1. The maximum potentiation by the other tested derivatives was significantly lower. In the OE, sedation could only be observed upon application of high doses of EK-6 and diazepam. None of the other derivatives reduced locomotion. In addition, a trend towards anxiolytic effects was observed for all tested derivatives. In the LDT, all studied derivatives led to a dose-dependent, increase in the time in the LA and to a comparable increase in the distance in the LA comparable to diazepam. Thus, all tested derivatives induced anxiolytic effects comparable, however without impairing locomotor activity. This work provides further insights into the preclinical exploration of potential anxiolytics.

8. Literaturverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Auta, J., Kadriu, B., Giusti, P., Costa, E., Guidotti, A., 2010. Anticonvulsant, anxiolytic, and non-sedating actions of imidazenil and other imidazo-benzodiazepine carboxamide derivatives. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 383–389. doi:10.1016/j.pbb.2010.02.016

Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R., Seale, B., 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* 187, 35–39.

Baburin, I., Beyl, S., Hering, S., 2006. Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 117–123. doi:10.1007/s00424-006-0125-y

Bali, M., Akabas, M.H., 2004. Defining the propofol binding site location on the GABAA receptor. *Mol. Pharmacol.* 65, 68–76. doi:10.1124/mol.65.1.68

Ben-Ari, Y., 2014. The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* 279, 187–219. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.001

Benke, D., Zemoura, K., Maier, P.J., 2012. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J. Biol. Chem.* 3, 61–72. doi:10.4331/wjbc.v3.i4.61

Bianchi, L., Driscoll, M., 2006. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook Online Rev. C Elegans Biol.* 1–16. doi:10.1895/wormbook.1.117.1

Boileau, A.J., Newell, J.G., Czajkowski, C., 2002. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J. Biol. Chem.* 277, 2931–2937. doi:10.1074/jbc.M109334200

Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55–65.

- Campagna-Slater**, V., Weaver, D.F., 2007. Anaesthetic binding sites for etomidate and propofol on a GABAA receptor model. *Neurosci. Lett.* 418, 28–33.
doi:10.1016/j.neulet.2007.02.091
- Campos**, A.C., Fogaça, M.V., Aguiar, D.C., Guimarães, F.S., 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatr. São Paulo Braz.* 1999 35 Suppl 2, S101–111. doi:10.1590/1516-4446-2013-1139
- Carver**, C.M., Reddy, D.S., 2013. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology (Berl.)* 230, 151–188. doi:10.1007/s00213-013-3276-5
- Cellot**, G., Cherubini, E., 2013. Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Front. Neural Circuits* 7, 136. doi:10.3389/fncir.2013.00136
- Chalifoux**, J.R., Carter, A.G., 2011. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 339–344. doi:10.1016/j.conb.2011.02.004
- Chiara**, D.C., Jayakar, S.S., Zhou, X., Zhang, X., Savechenkov, P.Y., Bruzik, K.S., Miller, K.W., Cohen, J.B., 2013. Specificity of intersubunit general anesthetic-binding sites in the transmembrane domain of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 19343–19357. doi:10.1074/jbc.M113.479725
- Chokroverty**, S., 2010. Overview of sleep & sleep disorders. *Indian J. Med. Res.* 131, 126–140.
- Curley**, A.A., Lewis, D.A., 2012. Cortical basket cell dysfunction in schizophrenia. *J. Physiol.* 590, 715–724. doi:10.1113/jphysiol.2011.224659
- Davies**, M., 2003. The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 28, 263–274.
- D’Hulst**, C., Atack, J.R., Kooy, R.F., 2009. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov. Today* 14, 866–875.
doi:10.1016/j.drudis.2009.06.009

D'Hulst, C., Kooy, R.F., 2007. The GABAA receptor: a novel target for treatment of fragile X? Trends Neurosci. 30, 425–431. doi:10.1016/j.tins.2007.06.003

Eckle, V.-S., Hucklenbruch, C., Todorovic, S.M., 2009. [What do we know about anesthetic mechanisms?: hypnosis, unresponsiveness to surgical incision and amnesia]. Anaesthesist 58, 1144–1149. doi:10.1007/s00101-009-1618-9

Ernst, M., Brauchart, D., Boresch, S., Sieghart, W., 2003. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. Neuroscience 119, 933–943.

Farrant, M., Nusser, Z., 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat. Rev. Neurosci. 6, 215–229. doi:10.1038/nrn1625

File, S.E., 2001. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. Behav. Brain Res. 125, 151–157.

Froestl, W., 2011. An historical perspective on GABAergic drugs. Future Med. Chem. 3, 163–175. doi:10.4155/fmc.10.285

Gadad, B.S., Daher, J.P.L., Hutchinson, E.K., Brayton, C.F., Dawson, T.M., Pletnikov, M.V., Watson, J., 2010. Effect of fenbendazole on three behavioral tests in male C57BL/6N mice. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS 49, 821–825.

Gassmann, M., Bettler, B., 2012. Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition. Nat. Rev. Neurosci. 13, 380–394. doi:10.1038/nrn3249

Greenfield, L.J., 2013. Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. Seizure 22, 589–600. doi:10.1016/j.seizure.2013.04.015

Griebel, G., Holmes, A., 2013. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 12, 667–687. doi:10.1038/nrd4075

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbaix, G., 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. Nature 233, 177–182.

Hamidi, S., Avoli, M., 2015. KCC2 function modulates in vitro ictogenesis. Neurobiol. Dis. 79, 51–58. doi:10.1016/j.nbd.2015.04.006

Hanson, S.M., Czajkowski, C., 2008. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3490–3499. doi:10.1523/JNEUROSCI.5727-07.2008

Hanson, S.M., Morlock, E.V., Satyshur, K.A., Czajkowski, C., 2008. Structural requirements for eszopiclone and zolpidem binding to the gamma-aminobutyric acid type-A (GABAA) receptor are different. *J. Med. Chem.* 51, 7243–7252. doi:10.1021/jm800889m

Hines, R.M., Davies, P.A., Moss, S.J., Maguire, J., 2012. Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 552–558. doi:10.1016/j.conb.2011.10.007

Hosie, A.M., Wilkins, M.E., da Silva, H.M.A., Smart, T.G., 2006. Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486–489. doi:10.1038/nature05324

Hosie, A.M., Wilkins, M.E., Smart, T.G., 2007. Neurosteroid binding sites on GABA(A) receptors. *Pharmacol. Ther.* 116, 7–19. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.011

Jacob, T.C., Moss, S.J., Jurd, R., 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 331–343. doi:10.1038/nrn2370

Jayakar, S.S., Zhou, X., Chiara, D.C., Dostalova, Z., Savechenkov, P.Y., Bruzik, K.S., Dailey, W.P., Miller, K.W., Eckenhoff, R.G., Cohen, J.B., 2014. Multiple propofol-binding sites in a γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) identified using a photoreactive propofol analog. *J. Biol. Chem.* 289, 27456–27468. doi:10.1074/jbc.M114.581728

Kash, T.L., Jenkins, A., Kelley, J.C., Trudell, J.R., Harrison, N.L., 2003. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* 421, 272–275. doi:10.1038/nature01280

Kash, T.L., Trudell, J.R., Harrison, N.L., 2004. Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 540–546. doi:10.1042/BST0320540

Khom, S., Strommer, B., Ramharter, J., Schwarz, T., Schwarzer, C., Erker, T., Ecker, G.F., Mulzer, J., Hering, S., 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br. J. Pharmacol.* 161, 65–78. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00865.x

Kloda, J.H., Czajkowski, C., 2007. Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha1 Met113-Leu132 region of the GABAA receptor. *Mol. Pharmacol.* 71, 483–493. doi:10.1124/mol.106.028662

Kotani, N., Akaike, N., 2013. The effects of volatile anesthetics on synaptic and extrasynaptic GABA-induced neurotransmission. *Brain Res. Bull.* 93, 69–79. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.08.001

Kumar, S., Porcu, P., Werner, D.F., Matthews, D.B., Diaz-Granados, J.L., Helfand, R.S., Morrow, A.L., 2009. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacology (Berl.)* 205, 529–564. doi:10.1007/s00213-009-1562-z

Li, G.-D., Chiara, D.C., Sawyer, G.W., Husain, S.S., Olsen, R.W., Cohen, J.B., 2006. Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 11599–11605. doi:10.1523/JNEUROSCI.3467-06.2006

Löscher, W., Rogawski, M.A., 2012. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 53 Suppl 8, 12–25. doi:10.1111/epi.12025

Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., Gallagher, M.J., 2012. GABAA Receptor Subunit Mutations and Genetic Epilepsies, in: Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).

Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., Gallagher, M.J., 2010. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J. Physiol.* 588, 1861–1869. doi:10.1113/jphysiol.2010.186999

Michels, G., Moss, S.J., 2007. GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 3–14. doi:10.1080/10409230601146219

Miller, P.S., Aricescu, A.R., 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512, 270–275. doi:10.1038/nature13293

Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62, 42–53. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.08.040

Möhler, H., 2011. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology* 60, 1042–1049. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.020

Möhler, H., 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 326, 505–516. doi:10.1007/s00441-006-0284-3

Möhler, H., Fritschy, J.-M., Crestani, F., Hensch, T., Rudolph, U., 2004. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1685–1690. doi:10.1016/j.bcp.2004.07.025

Möhler, H., Fritschy, J.M., Rudolph, U., 2002. A new benzodiazepine pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 2–8.

Newell, J.G., Czajkowski, C., 2003. The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J. Biol. Chem.* 278, 13166–13172. doi:10.1074/jbc.M211905200

Nutt, D.J., Stahl, S.M., 2010. Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 24, 1601–1612. doi:10.1177/0269881109106927

Oakley, S., Vedula, L.S., Bu, W., Meng, Q.C., Xi, J., Liu, R., Eckenhoff, R.G., Loll, P.J., 2012. Recognition of anesthetic barbiturates by a protein binding site: a high resolution structural analysis. *PloS One* 7, e32070. doi:10.1371/journal.pone.0032070

Olsen, R.W., Hancher, H.J., Meera, P., Wallner, M., 2007. GABAA receptor subtypes: the “one glass of wine” receptors. *Alcohol Fayettev. N* 41, 201–209. doi:10.1016/j.alcohol.2007.04.006

Olsen, R.W., Li, G.-D., 2011. GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Can. J. Anaesth. J. Can. Anesth.* 58, 206–215. doi:10.1007/s12630-010-9429-7

Olsen, R.W., Sieghart, W., 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56, 141–148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045

Olsen, R.W., Sieghart, W., 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol. Rev.* 60, 243–260. doi:10.1124/pr.108.00505

Owens, D.F., Kriegstein, A.R., 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715–727. doi:10.1038/nrn919

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., Sperk, G., 2000. GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.

Roberts, E., Frankel, S., 1950. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187, 55–63.

Rudolph, U., Antkowiak, B., 2004. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 709–720. doi:10.1038/nrn1496

Rudolph, U., Crestani, F., Möhler, H., 2001. GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 188–194.

Rudolph, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 685–697. doi:10.1038/nrd3502

- Rudolph**, U., Möhler, H., 2014. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 483–507. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135947
- Rudolph**, U., Möhler, H., 2006. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 18–23. doi:10.1016/j.coph.2005.10.003
- Schwabe**, K., Freudenberg, F., Koch, M., 2007. Selective breeding of reduced sensorimotor gating in Wistar rats. *Behav. Genet.* 37, 706–712. doi:10.1007/s10519-007-9166-z
- Sieghart**, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Ernst, M., 2012. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. *Br. J. Pharmacol.* 166, 476–485. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01779.x
- Sigel**, E., Steinmann, M.E., 2012. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–40231. doi:10.1074/jbc.R112.386664
- Skolnick**, P., 2012. Anxiolytic anxiolytics: on a quest for the Holy Grail. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 611–620. doi:10.1016/j.tips.2012.08.003
- Tan**, K.R., Rudolph, U., Lüscher, C., 2011. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci.* 34, 188–197. doi:10.1016/j.tins.2011.01.004
- Treiman**, D.M., 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3, 8–12.
- Treven**, M., Koenig, X., Assadpour, E., Gantumur, E., Meyer, C., Hilber, K., Boehm, S., Kubista, H., 2015. The anticonvulsant retigabine is a subtype selective modulator of GABAA receptors. *Epilepsia* 56, 647–657. doi:10.1111/epi.12950
- Uusi-Oukari**, M., Korpi, E.R., 2010. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol. Rev.* 62, 97–135. doi:10.1124/pr.109.002063
- Wagner**, D.A., Czajkowski, C., 2001. Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 67–74.

Wallner, M., Hancher, H.J., Olsen, R.W., 2003. Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15218–15223. doi:10.1073/pnas.2435171100

Wang, D.D., Kriegstein, A.R., 2010. Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 21, 574–587. doi:10.1093/cercor/bhq124

Whiting, P.J., 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* 8, 445–450.

Winsky-Sommerer, R., 2009. Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *Eur. J. Neurosci.* 29, 1779–1794. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06716.x

9. Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichsten Dank.

An erster Stelle möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes und den ermöglichten Einblick in die präklinische Forschung am *Department für Pharmakologie und Toxikologie* bedanken.

Mein ganz besonderer und größter Dank gilt Mag. Dr. Sophia Khom, die mir mit ihrer fachlich kompetenten Betreuung und enormen Hilfsbereitschaft, sowohl im praktischen als auch im schriftlichen Teil der Arbeit sehr geholfen hat.

Weiters bedanke ich mich bei Mag. Juliane Hintersteiner, die mich bei den *in vivo* Arbeiten begleitet hat und auch für andere Fragen ein offenes Ohr hatte. Ebenso möchte ich mich bei Mag. Denise Luger und auch Mag. Angela Schöffmann bedanken, die mich bei der *in vitro* Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Bei Mag. Dr. Igor Baburin bedanke ich mich für die Hilfe bei technischen Problemen.

Bei allen anderen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern dieses Departments und anderer Institute, die an dieser Diplomarbeit beteiligt waren, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Für alle erdenklichen Arten der Unterstützung, danke ich meinem Bruder Stefan, meinem Onkel Univ.-Prof. Dr. Reinhard Kirnbauer und allen anderen Verwandten, meinen Freunden, und allen voran meiner Freundin, die immer an meiner Seite standen und mein Leben bereichern.

Zuletzt möchte ich die Gelegenheit ergreifen und auch meinen Eltern Mag. Dieter und Mag. Claudia † Kirnbauer danken, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben.

10. Lebenslauf

Angaben zur Person	
Vorname / Nachname	Erwin Kirnbauer
E-Mail	erwinkirnbauer@hotmail.com
Schul- und Berufsbildung	
10/2006 - 07/2015	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
01/2006 - 06/2006	Grundwehrdienst mit Ausbildung zum Kraftfahrer
1997 - 2005	BG und BRG Braunau Realgymnasium mit Laborzweig ab 3.Klasse
1993 - 1997	Volksschule Mattighofen
Sprachen	
	Deutsch
	Englisch (B2)
	Latein (Schulkenntnisse)
Bisherige Berufserfahrung	
06/2015	Apotheke in der Wiesen, Wien
08/2013	Columbusapotheke, Linz
09/2005, 07/2006, 02/2015	Sonnenapotheke, Mattighofen